

海産魚循環式養殖における飼育排水、沈殿物および 泡沫分離物を用いた微細藻類の培養に関する研究

著者	張 辰
学位授与機関	東京海洋大学
学位授与年度	2013
URL	http://id.nii.ac.jp/1342/00001023/

修士学位論文

海産魚循環式養殖における飼育排水、
沈殿物および泡沫分離物を用いた
微細藻類の培養に関する研究

平成 25 年度
(2013 年 9 月)

東京海洋大学大学院
海洋科学技術研究科
海洋生命科学専攻
張 烜辰

[修士]

修士学位論文内容要旨 Abstract

専攻 Major	海洋生命科学専攻	氏名 Name	張 烜辰
論文題目 Title	海産魚循環式養殖における飼育排水、沈殿物および泡沫分離物を用いた微細藻類の培養に関する研究		

トラフグの閉鎖循環式養殖における飼育排水や沈殿物(養魚廃棄物)に蓄積された物質の除去・再利用を目的に、クルマエビ幼生等の初期餌料となるキートセロス *Chaetoceros gracilis* およびテトラセルミス *Tetraselmis tetrathele* を用いて培養を試みた。

まず、キートセロスおよびテトラセルミスを通常用いられる F 培地で培養し、藻体組成から増殖特性を把握した。次に閉鎖循環式養殖システムの飼育排水や回収された沈殿物の元素組成を把握し、藻体組成との比較を行い、窒素を基準として培養に用いる飼育排水と沈殿物の希釈率を設定し、藻類の必要量が絶対的に不足している元素を特定した。その結果、鉄およびマンガンが絶対的に不足することが明らかとなった。

実際に飼育排水と硫酸で可溶化した沈殿物を混合して培地を作製し、キートセロスおよびテトラセルミスの培養を行うとともに、不足元素である鉄およびマンガンの添加効果も調査した。キートセロスは飼育排水+沈殿物+Fe+Mn 区で細胞密度・乾燥重量において他の区よりも高い値を示したが、最大密度に達するまでの期間が最も長くなった。一方、飼育排水区では最大密度が最も低かった。飼育排水+沈殿物区でも培養は可能であったが、鉄やマンガン添加した区の最大密度が高いことから、不足元素の添加効果が認められた。一方、テトラセルミスでは飼育排水区以外の区で F 培地と同等もしくはそれを上回る培養結果が得られた。しかし、不足元素を添加した区では添加しない区と比較し、若干高い藻体回収量が得られた。

培養結果から、F 培地と十分な藻体回収が可能な飼育排水+沈殿物+Fe+Mn 培地で拡大培養を行った後、藻体を回収して粗脂肪・粗タンパク含量および脂肪酸・構成アミノ組成・遊離アミノ組成の比較を行った。キートセロスの粗脂肪含量は飼育排水+沈殿物+Fe+Mn 培地区が F 培地より 1.4 倍多かったが、n-3 高度不飽和脂肪酸(n-3HUFA)含量および粗タンパク質含量では大きな差は見られなかった。構成アミノ組成において差は認められなかったが、遊離アミノ酸含量について必須アミノ酸含量は養魚廃棄物+Fe+Mn 培地区が F 培地より 1.7 倍多かった。非必須アミノ酸の含量は養魚廃棄物+Fe+Mn 区が F 培地より 2.2 倍多かった。一方、テトラセルミスでは分析した全項目においてほとんど差は見られなかった。

本研究から閉鎖循環式養殖システムから回収された物質に不足元素を添加することでキートセロスおよびテトラセルミスの培養が十分に可能であることが明らかとなり、栄養についても合成培地と同等かそれ以上の栄養素を含むことが明らかとなった。

海産魚循環式養殖における飼育排水、
沈殿物および泡沫分離物を用いた
微細藻類の培養に関する研究

目 次

	頁
緒言	1
第 1 章 飼育排水、沈殿物および泡沫分離物を用いた 微細藻類の培養可能性の検討	6
小括	19
図表	21
第 2 章 養魚廃棄物を用いたキートセロスおよび テトラセルミスの培養	27
小括	39
図表	40
第 3 章 水産生物の初期餌料としての藻体の栄養分析	54
小括	61
図表	62
総括	66
謝辞	69
引用文献	70

緒 言

中国は 14 億以上の人口を抱える国であり、さまざまな食材を大量消費している。特に近年、中国市場の水産養殖産品の需要量が増加してきている。しかし、海面は限られており、供給可能な量には上限がある。

既に世界中で魚の過剰漁獲の防止対策が始まっており、今後持続可能な漁業を継続するためには、漁獲漁業生産量増加率はゼロかマイナスにすることが必須である。中国では 1999 年には、TAC 制を取り入れ漁獲規制を始めており、現場がその規制を厳守できれば、中国も漁獲量ゼロ成長へ路線を転換できるものと考えられる。

一方、中国の養殖生産量の成長率は 5%/年であり、毎年日本一国の生産量をはるかに超える量を増産していることになる (FAO, 2012)。生産量の正確さに問題もあるが、中国国内で大規模な養殖場が運営され、増加していることは確かである。将来的にはこれらの養殖場から排出される物質が自然環境へ流出し、甚大な環境破壊を引き起こすことも懸念される。また、これらを防止する観点から、窒素・リン等の環境汚濁物質を規制する法律の厳格化も考えられ、早急に環境負荷低減型の養殖技術を確立する必要がある。

そこで、飼育水の入れ換えや定常的な給排水を伴わずに、飼育水を高度に浄化することによって完全循環を行う「閉鎖循環式養殖システム (Closed Recirculating Aquaculture System)」がある (辻・小泉, 2009)。閉鎖循環式養殖システムは、水量調整のみの注水だけを行い、排水を行わないので環境負荷低減が可能な養殖システムである (丸山ら, 1998; 吉野ら, 1999)。さらに、

閉鎖循環式養殖は、自然環境からの影響を受けにくく、環境制御、それに伴った生産性の向上および感染症の防止が可能である(遠藤, 2010)。以上の利点より、閉鎖循環式養殖システムは次世代の養殖を担う養殖システムであると考ええる。

しかし、閉鎖循環式養殖システムは、天然水域へ排水を行わないため、残餌や排泄物などの養魚廃棄物はシステム内に蓄積される。この養魚廃棄物は適宜除去しなければならず、これまでにこれら養魚廃棄物の有効利用について様々な方法が考えられてきた。物理的、化学的もしくは生物的な方法で水そのものを処理する方法や植物体にこれら養魚廃棄物を吸収させる方法である。

植物体にこれら養魚廃棄物を吸収させる 1 つの方法として、養魚廃棄物を水耕栽培の液肥として用いるアクアポニックス (Aquaponics)がある。水耕栽培システムへ十分な量の栄養塩を供給可能な閉鎖循環式養殖システムは、アクアポニックスに最適であると考えられている (Seawright et al., 1998; Rafiee and Saad, 2005)。しかしながら、アクアポニックスで実用化に至っているシステムは、現段階では淡水型の養殖システムと野菜などの水耕栽培との連携システムに限定されている。

海産魚類の養殖においては、大型藻類の培養によってシステム内に蓄積する栄養塩を吸収する試みがなされており、ミナミアオサ *Ulva ohnoi* の培養に成功し、藻体への硝酸態窒素とリン酸態リンの吸収が確認されている。しかしながら、この方法で生産された藻体を以後どのように利用するかが課題とされている(能登谷, 2001)。

そこで、それらを解決する方法として、「閉鎖生態系循環式養殖システム (Closed Ecological Recirculating Aquaculture System, CERAS)」の適用が提唱されている。CERAS は循環式養殖システムへ水圏の食物連鎖を模擬した物質循環型餌料生物生産システムを導入し、養魚飼育排水および堆積物に含まれる栄養塩から植物プランクトンを培養し、さらに培養した植物プランクトンを用いて魚類の餌となる動物プランクトンを増殖させるものである(遠藤・竹内, 2013)。これまでの研究により、ティラピア *Oreochromis niloticus* の養魚廃棄物を用いた緑藻セネデスムス *Scenedesmus quadricauda* (遠藤・竹内, 2004) や、クロレラ *Chlorella vulgaris* の培養、さらに養魚廃棄物を用いて培養したクロレラを利用したタマミジンコ *Moina macrocopa* の生産にも成功している(森ら, 2006)。また、海水魚への応用を目的としてトラフグ *Takifugu rubripes* の飼育排水、沈殿物および泡沫分離物(以下、養魚廃棄物)を用いて種々の生物餌料の餌となるナンノクロロプシス *Nannochloropsis oculata* の培養にも成功している(滝田, 2012)。そこで本研究では閉鎖生態系循環式養殖システムを海産魚介類の飼育システムに組み込む一環として養魚廃棄物を用いたキートセロス *Chaetoceros gracilis* およびテトラセルミス *Tetraselmis tetrathele* の培養に着目した。

研究で用いるキートセロス *C. gracilis* は珪藻綱円心目キートセロス科であり、浮遊性珪藻に分類される。大きさは直径 4~8 μ m である。特徴としてエイコサペンタエン酸(EPA)を多量に含む(岡内, 2002)ため、アサリ *Ruditapes philippinarum* などの貝

類やクルマエビ *Marsupenaeus japonicas* 幼生のゾエア期、ミシス期 (Ronquillo et al., 1997; Lim and Hirayama, 1993ab) の餌料として用いられている。また、プラシノ藻類であるテトラセルミス *T. tetrathele* は長径 10~15 μ m, 短径 6~10 μ m であり、ほぼ同じ長さの 4 本の鞭毛を有し、この鞭毛で活発に遊泳する。プラシノ藻類は、細胞壁をつくっている物質や光合成によりできる物質が緑藻類とは異なるため、分類学上は異なるグループに分類される。通常 1 個の細胞が均等に分かれる二分裂で増殖し、明暗周期がある条件下で暗期の期間に運動が停止して分裂が開始され、明期の期間に分裂した細胞が遊泳する (岡内・福所, 1984; 岡内, 1988)。テトラセルミスはタンパク質含量が高く、リノレン酸を多く含むため、クルマエビ類などの餌として使用されている (藤田ら, 1986)。一方、海産動物の必須脂肪酸の一つである EPA の含量はやや少ないのが特徴である。広い範囲の温度 (20~30°C) や塩分条件下で良好に増殖するため、日本の温暖な地域や東南アジアなど熱帯・亜熱帯地域で水産無脊椎動物の餌料として大量培養されている (岡内, 1988)。

本研究の第 1 章では、CERAS における食物連鎖サイクルの一部を成す、養魚廃棄物－植物プランクトン間の物質移動に関する基礎的知見の取得を目的とし、廃棄物にはトラフグ *T. rubripes* 飼育廃棄物を、植物プランクトンにはキートセロス *C. gracilis* およびテトラセルミス *T. tetrathele* を用いて、両プランクトンの培養が可能な培地組成について検討した。具体的にはキートセロス、テトラセルミス藻体の元素含有量を、トラフグ飼育排水中の窒素濃度と両藻体中の窒素含有量が同等である

と仮定した時に他元素を比較して培養に必要な元素の過不足を判定した。

次に第 2 章第 1 節で、第 1 章で検討した培地で実際にキートセロスおよびテトラセルミスを培養し、培養可能であるかを検討した。第 1 章の結果から養魚廃棄物で培地を作製した際には鉄、マンガンはいずれの養魚廃棄物を混合しても藻体中の含有量に到達せず、鉄およびマンガンが絶対的に不足することが判明したため、不足元素添加区においては、不足元素である鉄とマンガンの添加効果も調査した。第 2 節では、第 1 節の結果を踏まえ、最も増殖成績が良好であった養魚廃棄物+Fe+Mn 培地と、通常の培養で用いられる合成培地の F 培地を用いてキートセロスとテトラセルミスを拡大培養し、培養終了後それぞれの藻体を回収した。珪藻をはじめ、貝類や甲殻類など水産における有用無脊椎動物の初期餌料としての微細藻類藻体の栄養価に関する知見は、仔稚魚の初期餌料と比較すると少ないことから、貝類やクルマエビの餌料としてそれぞれの藻体を利用する観点から藻体の栄養分析を行った。

第 1 章

飼育排水、沈殿物および泡沫分離物を用いた

微細藻類の培養可能性の検討

キートセロスおよびテトラセルミスをはじめとする藻体は、自ら必要とする元素のみを吸収し、その藻体組成に反映させる。したがって、藻体組成に類似した元素割合の培地を作製することで効率的な藻体の生産を行うことが可能であると考えられる。その為、養殖廃棄物を用いて培養するにあたり、藻体が必要とする元素および培地中の元素濃度を把握することが必要となる。そこで海産微細藻類における一般的な人工合成培地である F 培地を用いてキートセロスおよびテトラセルミスの培養を行うことにより、一般的な藻体組成を把握した。さらに閉鎖循環式養殖システムを利用してトラフグを飼育した際の飼育排水、沈殿物、泡沫分離装置内の液体および固形物の元素濃度および含有量とキートセロスおよびテトラセルミス藻体の元素含有量を飼育排水の窒素濃度とキートセロスおよびテトラセルミスの窒素含有量を 100%として比較し、藻体に対するトラフグ飼育廃棄物 4 種に含まれる元素濃度および含有量の過不足判定を行った。

第 1 節

F 培地を用いた微細藻類の培養による藻体組成の把握

養殖廃棄物を用いて培養するにあたり、藻体が必要とする元素および培地中の元素濃度を把握することが必要となる。そこで一般的な藻類培養培地である人工合成培地、F 培地を用いてキートセロスおよびテトラセルミスの培養を行うことにより、一般的な藻体組成を把握した。

材料および方法

供試生物

キートセロス *C. gracilis* およびテトラセルミス *T. tetrathele* は独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所養殖技術部より分与され、F 培地で継代培養した株を用いた。なお、F 培地は Guillard and Ryther (1962)の方法に従って作製した。

培養装置および培養条件

培養液は F 培地をそれぞれ 1L 用いた。F 培地は使用前に薬品を混合し、高圧蒸気滅菌(121°C, 30 分)を施した。培養には 1L ガラスフラスコ(柴田科学(株))を用い、滅菌した F 培地へ藻体藻類懸濁液を 10mL/L 培地の割合で接種した。接種時の藻体細胞密度およびバイオマスはキートセロスが 1.49×10^5 cells/mL および 6.57mg dry weight/L、テトラセルミスが 0.32×10^5 cells/mL および 9.05mg dry weight/L であった。通気による細菌のコンタミネーションを防ぐた

め、吸気口に PTFE メンブレン装着フィルターユニット (Millex FH50、日本ミリポア(株))、排気口にシリコン栓 (C-30、信越ポリマー(株)) を取り付け、無調整空気を 3L/min の割合で通気した。光源には白色蛍光灯 (FI40SS-W/37、東芝(株)) を用い、平均光合成有効光量子束密度 (以下 PPFD と表記) が $243.7\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、12 時間明期、12 時間明暗期 (以下 12L : 12D と表記) の光周期において下方から上方へと照射した。培養時の温度は $27.5\pm0.2^\circ\text{C}$ 、培養期間は 10 日であった。

藻体回収

培養終了後、それぞれの藻体懸濁液を遠心分離機 (SPX-201、トミー工業(株)) により 8,300rpm、10 分間の遠心分離を行い、藻体を回収した (加藤ら, 2004) 後、 -80°C で予備凍結し、凍結乾燥機で凍結乾燥を行った。それぞれ培養前後の乾燥重量と細胞密度から増殖率を求めた。

増殖率の算出

乾燥重量法と細胞計数法により増殖率を求めた。細胞計数法は培養中、培養グラスコに装着したサンプリングチューブより一定量、シリンジを使用してサンプリングし、トーマの血球計算板により毎日細胞を計数した。実験終了時の細胞密度は藻体を回収する直前の細胞密度とした。また、サンプリングの際には、蒸発と前回のサンプリングにより減少した培養液を蒸留水 (以下、DW と表記) で補充した。

乾燥重量は、培養後に遠心分離により藻体を回収し、凍結乾燥を行った後、秤量した。増殖率の算出は以下の式で行った。

$$SGR = (\text{Ln}(Mf) - \text{Ln}(Mi)) / t \times 100 \quad (1)$$

SGR : 増殖率(%/day)

M_f : 実験終了時の細胞数(cell/L)もしくは、バイオマス(mg/L)

M_i : 実験開始時の細胞数(cell/L) もしくは、バイオマス(mg/L)

t : 培養期間(day)

藻体組成

それぞれの試料をマイクロウェーブ試料分解装置(Model 7295, O. I. Analytical)により、前処理を行った。乾燥試料 0.15g に対して濃硫酸(97%)を 3mL 加え、175°C で 10 分間のマイクロ波加熱処理を行い、その後、15%の過酸化水素を 3mL 加え、125°C で 5 分間のマイクロ波加熱処理を行った。処理後の試料は脱イオン水で 100mL に定容し、元素分析に供した。藻体中の窒素含量は全有機炭素計(TOC-V_{CSH}, (株)島津製作所)に付随する全窒素ユニット(TNM-1, (株)島津製作所)により測定を行った。その他の元素(リン、カリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、マンガン、コバルト、銅、亜鉛、およびモリブデン)の測定には誘導結合プラズマ発光分析装置(SPS7800, エスアイアイ・ナノテクノロジー(株); 以下 ICP-AES と表記)を用いた。なお、分析元素は張(2000)を参考に決定した。

結 果

細胞密度

キートセロスおよびテトラセルミスの増殖曲線を Fig.1 に示す。キートセロスの培養は培養開始 5 日後に最高細胞密度 $1.81 \pm 0.38 \times 10^7$ cells/mL に達した。テトラセルミスの培養は培養開始 7 日後に最高細胞密度 $3.77 \pm 0.70 \times 10^6$ cells/mL に達した。それ以後、両者と

も細胞密度の増加が停滞し、減少が見られたので培養を終了した。

増殖率

培養前後の細胞計数および培養後の乾燥重量により求めた現存量を Table 1 に示す。細胞計数によるキートセロスの比増殖率は 57.59%、テトラセルミスでは 50.55%となった。一方、乾燥重量ではキートセロスで 59.29%、テトラセルミスで 53.86%となった。両者とも比成長率は乾燥重量で若干高い値となった。

藻体組成

F 培地で培養したキートセロスおよびテトラセルミス藻体における乾燥重量当たりの窒素およびミネラル組成を Table 2 に示す。キートセロスの窒素 29.92mg/g、カリウム 21.33 mg/g、マグネシウム 14.31 mg/g、およびカルシウム 3.37 mg/g の順に高い含有量を示した。テトラセルミスではカルシウム 34.58 mg/g、窒素 21.26mg/g、カリウム 9.83 mg/g、およびマグネシウム 8.65 mg/g の順に高い含有量を示した。カリウム、マグネシウムおよびカルシウムは海水中に高濃度で含有しているため、藻体に大量に含まれていると推察された。

考 察

F 培地による培養結果からキートセロスでは初期細胞密度 1.49×10^5 cells/mL で 5 日後に最高細胞密度 1.81×10^7 cell/mL に達し、テトラセルミスでは初期細胞密度 0.32×10^5 cells/mL で 7 日後に最高細胞密度 3.77×10^6 cell/mL に達した。これは実際にトラフグの養殖廃棄物を用いて培養を行う際の細胞増殖速度の指標になると考えられる。

本実験で用いた F 培地は、各種微細藻類において生物的な特性を研究するために作製されたもので大量生産や培地中からの栄養塩除去を目的としていない。一般的に大量生産用に用いられる培地に屋島培地(平田, 1965)があるが、構成成分である硫酸アンモニウムの過剰な添加により、高水温、高塩分および高 pH 下において有害な非解離アンモニアの増加が懸念される(Bower and Bidwell, 1978)。また、リン酸カルシウムは、使用前に不要物を取り除く必要があり使用上に問題があるとされている。このことから、窒素やリンが高濃度に蓄積していると予想される養殖廃棄物を培地に用いることで、より安全で効率的に微細藻類の生産が可能であると考えられる。

第 2 節

養殖廃棄物の元素組成の把握

養殖廃棄物の元素組成を把握し、藻体組成と比較することで培養に用いる培養液の希釈倍率を決定することを目的とした。

材料および方法

養殖廃棄物

今回、分析に用いた養殖廃棄物は、東京海洋大学水族養殖学研究室の保有する、泡沫分離装置および間欠式濾過装置による循環濾過式飼育システム(Foam Fractionator and Intermittent Filter, FFIF)を用いてトラフグ稚魚を 70 日間飼育した際に排出された飼育排水、沈殿物、泡沫分離装置により分離された排水(以下、泡沫液体と表記)および同様に分離された固形物(以下、泡沫固体と表記)の 4 種とした。これら 4 種の養殖廃棄物は以前の研究(伊勢田, 2008)で採取されたものを利用した。飼育排水は保存用に濃塩酸を 1L に対して 1mL 添加し、沈殿物、泡沫固体は第 1 説と同様にマイクロウェーブ試料分解装置を用いて、硫酸分解ならびに過酸化水素による脱色を行った。

分析方法

全窒素は、養殖廃棄物 4 種とも第 1 節と同様に TOC 計に付随する TN ユニットにより測定を行った。その他の元素(リン、カリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、マンガン、コバルト、銅、亜鉛、およびモリブデン)は ICP-AES により測定を行った。なお、分析項

目は金子(2011)を参考に決定した。

結 果

飼育排水および泡沫液体における全窒素とミネラルの濃度、固形沈殿物および泡沫固体の窒素およびミネラル組成を Table 3 にまとめて示す。飼育排水と泡沫液体間での比較では飼育排水において、窒素 381.9 mg/L、マグネシウム 1243.5mg/L、カリウム 608.4 mg/L、カルシウム 851.7 mg/L、銅およびモリブデンがそれぞれ 154.3μg/L および 12.7mg/L と相対的に高く、泡沫液体ではリン 41.9 mg/L、鉄 1859.7μg/L、マンガンおよび亜鉛がそれぞれ 149.2μg/L および 929.5μg/L と相対的に高い含有濃度を示した。コバルトは飼育排水および泡沫液体においてそれぞれ 84.8μg/L と 89.3μg/L で双方に大きな差異が見られなかった。

固形沈殿物と泡沫固体の窒素およびミネラル組成を比較すると、沈殿物ではリン 100.5 mg/g、カルシウム 188.7 mg/g、およびモリブデン 3.2 mg/g と泡沫固体に比較して相対的に高い値を示した。一方、泡沫固体では窒素 69.0 mg/g、マグネシウム 13.8 mg/g、鉄 2.2 mg/g、銅および亜鉛がそれぞれ 146.7μg/g と 675.2μg/g、と高い元素含有量を示した。固形沈殿物および泡沫固体の両者においてカリウムは 38.7 mg/g および 38.8 mg/g、マンガンは 171.9μg/g および 181.3μg/g、コバルトは 49.6μg/g および 47.1μg/g と差は見られなかった。

考 察

本分析の結果から、閉鎖循環式養殖システムを用いたトラフグ飼

育において測定した元素蓄積形態が明らかになった。飼育排水と泡沫分離液体を比較すると鉄および亜鉛が泡沫分離により高濃度に蓄積されていることが分かる (Table 3)。これは泡沫分離装置により、鉄および亜鉛が除去されることを示しているが、イオン態として液体で除去されたものか、固形物として回収された後、液体部分へ溶出したものかについては不明である。鈴木・丸山 (2001) は鉄塩凝集剤と乳製カゼインを用いて泡沫分離の検討を行っている。鉄には凝集作用があり、亜鉛も同様に凝集した後、泡沫分離されて回収槽に蓄積したものと考えられる。一方、固形沈殿物と泡沫固体との比較では固形沈殿物に含まれるリンとカルシウムが泡沫固体のそれを大きく上回り、窒素では大きく下回った。これは餌から供給され、排出されたリン酸カルシウム類が沈殿物として回収され、泡沫分離固体ではタンパク質を含む浮遊懸濁物が飼育水から除去された結果であると考えられる。また、液体廃棄物と固体廃棄物に分けて比較すると窒素、カリウム、マグネシウムは液体廃棄物に、リンは固形廃棄物に蓄積される傾向が見られた。

第 3 節

養殖廃棄物を用いたキートセロスおよび

テトラセルミス培地の検討

第 1 節および第 2 節の結果から、藻体中の元素含有量と養殖廃棄物 4 種の元素濃度および含有量の割合を比較し、その結果から藻体中の元素含有量を、培養に必要な元素量とした際の養殖廃棄物 4 種類の元素含有量の過不足を判定し、それぞれの藻類の培養が可能であるかを検討した。

方 法

藻体中の元素含有量に対する養殖廃棄物 4 種の元素濃度・含有量の過不足判定は以下の手順により算出し。

飼育装置内の沈殿物、泡沫分離装置内の液体および固形物の全回収量(重量(g)もしくは 容量(L))をシステムの全水量(L)で割ることにより、飼育排水 1L 当たりに含まれるそれぞれの重量を算出した。次に、算出した飼育排水 1L 当たりに含まれる重量および容量に各元素濃度・含有量を乗算し、養殖廃棄物 4 種における飼育水 1L 当たりの元素含有量を把握した。飼育排水 1L 当たりの養殖廃棄物 4 種における元素含有量において、飼育終了時の飼育排水中の窒素を 1 としたときに、それに相応する飼育終了時における飼育排水のその他元素およびその他の飼育排水 3 種の各元素の値を算出し、その値を藻体中窒素含有量を 1 とした値で除算し、その割合を示した。

結 果

上記の方法により算出した窒素を基準とした藻体組成中の元素含有量と養殖廃棄物のミネラル組成の比較を、キートセロスは Fig. 2 に、テトラセルミスは Fig. 3 にそれぞれ示す。

この値が 100%になる場合、藻体中元素含有量と、養殖廃棄物中元素組成比が同等であることを示し、100%以上であれば養殖廃棄物中の元素含有量の方が多いことを示す。逆に 100%以下ならば藻体組成の元素含有量が多いことを示す。

キートセロスは、飼育排水のみで、カリウム 681.0%、マグネシウム 223.5%、カルシウム 1979.4%、コバルト 139.3%、銅およびモリブデンはそれぞれ 225.7%および 1949.8%と藻体中の含有量を十分に満たすことが明らかとなった。また、リンおよび亜鉛も泡沫固体や固形沈殿物と混合すると、309.1%および 187.8%の割合となり、藻体中の含有量を満たすことが可能であることも分かった。しかし、4 種類の廃棄物を混合しでも鉄では 0.63%、マンガンでは 12.2%と藻体中の含有量と比較すると大幅に不足する結果となった。

テトラセルミスでは、飼育排水のみでリン 135.9%、カリウム 344.5%、マグネシウム 800.0%、カルシウム 137.1%、コバルトおよびモリブデンはそれぞれ 113.19%および 124.37%と藻体中の含有量を十分に上回る結果となった。また、飼育排水のみでは 100%を下回る銅および亜鉛も泡沫固体や固形沈殿物と混合することで、101.87%および 188.51%となり、藻体中の含有量を満たすことが可能であることが分かった。キートセロスと同様に、4 種類の廃棄物を混合して培地を作製した場合でも鉄

は 1.1%、マンガンは 12.7%となり、藻体中の含有量と比較すると絶対量が不足している結果となった。

考 察

微細藻類は通常、必要とする元素のみを吸収し、自らの組成に反映する。微細藻類の増殖については、必要とされる元素のうち、供給された量の最も少ないものに影響される。その元素が不足し始めると栄養塩の制限要因となり、微細藻類の増殖が停止する(原島, 2008)。つまりは、養殖廃棄物 4 種の元素濃度・含有量の組成比において全ての元素において 100%を越えた場合は、藻体の培養が可能だと考えられる。このことから、養殖廃棄物培地を用いた微細藻類の増殖を考える上で、藻体の要求する栄養素およびその要求量、ならびに培地として使用する養殖廃棄物の元素組成を把握する必要がある。

本研究において、飼育排水窒素とキートセロス、テトラセルミスの窒素含量を等しいとしてその他のミネラル組成の比較をおこなったが、キートセロスではマグネシウム、カリウム、カルシウム、コバルト、銅、モリブデンは飼育排水のみで 100%を超える結果となり、リンおよび亜鉛は飼育排水に固形沈殿物、泡沫分離物の元素を添加することで 100%を超えることが明らかとなった。しかしながら、鉄、マンガンは養殖廃棄物 4 種を混合しても藻体組成を参考に算出した必要元素量に達しなかった。以上のことから、養殖廃棄物培地を作製する際には鉄およびマンガンの添加が必要であると考えられた。一方、テトラセルミスではリン、マグネシウム、カリウム、カルシウム、コ

バルト、モリブデンは飼育排水のみで 100%を超える結果となり、銅および亜鉛は飼育排水に固形沈殿物、泡沫分離物の元素を添加することで 100%を超えることが明らかとなった。キートセロスと同様に鉄とマンガンに関しては養殖廃棄物 4 種の元素を混合しても藻体組成を参考に算出した必要元素量に達しなかった。このことから、同様に鉄およびマンガンを外部から添加する必要があると考えられた。

飼育排水の窒素は概ね硝酸態であるとともに、リンではオルトリン酸態である(伊勢田, 2008)ことから、キートセロスおよびテトラセルミスの培養に濃度的にも十分な量を含んでいることも明らかとなった(Figs. 3 および 4)。前述のように生産用として多くの種苗生産機関で用いられている屋島培地(平田, 1965)は窒素源として硫酸アンモニウムを使用しており、硝酸塩よりも毒性が高いことから、餌料の生産の際に悪影響を及ぼす可能性がある。この点、飼育排水はより安全かつ効率的に微細藻類の培養が可能と考えられる。一方、主に研究用に用いられている F 培地(Guillard and Ryther, 1963; Guillard, 1975)は高価な試薬から作製されるため、廃棄物で藻類培養が可能であればより安価に培養が可能になると考えられる。

小 括

第 1 章では通常の培養で用いられる F 培地を用いてキートセロスおよびテトラセルミスの培養を行い、藻体の窒素およびミネラル組成を把握するとともにトラフグの閉鎖循環式養殖システムによる飼育で廃棄された飼育排水、固形沈殿物および泡沫分離物の組成について把握し、両者の組成の比率からそれぞれの微細藻類が培養可能な培地の組成について検討を行った。

第 1 節では F 培地でキートセロスおよびテトラセルミスの培養を行い、培養後に回収した藻体の窒素およびミネラル含量を把握した。第 2 節ではトラフグの閉鎖循環式養殖システムによる飼育で廃棄された飼育排水、固形沈殿物および泡沫分離物の組成について特性を把握した。第 3 節では飼育排水の窒素と藻体に含有する窒素を同等として他元素の量的比較を行った。その結果、キートセロス、テトラセルミスの両方で鉄およびマンガンが養魚廃棄物を培地として用いた藻類培養を行う際に絶対的に不足することが明らかとなった。

そこで第 2 章では F 培地を対照区として、実際に閉鎖循環式養殖システムから排出される養魚廃棄物からの栄養塩除去と微細藻類の生産を同時に行うシステムを想定して実験を行うこととした。固形沈殿物や泡沫固体を硫酸および過酸化水素より可溶化し、飼育排水のみを希釈する試験区、養殖廃棄物の有効利用を目的として可溶化した固形物を混合する養殖廃棄物区およびそれら養殖廃棄物培地に絶対量が不足すると考えら

れる鉄、マンガンを片方ずつ、もしくは両方とも添加する試験区を設けて実培養試験を行う。また、これらの試験区において得られた藻体および対照区で使用する F 培地を用いてキートセロスとテトラセルミスを経大培養し、培養終了後それぞれの藻体を回収し、水産生物用の餌料として利用する観点から栄養分析を行い、藻体利用の可能性について検討することとした。

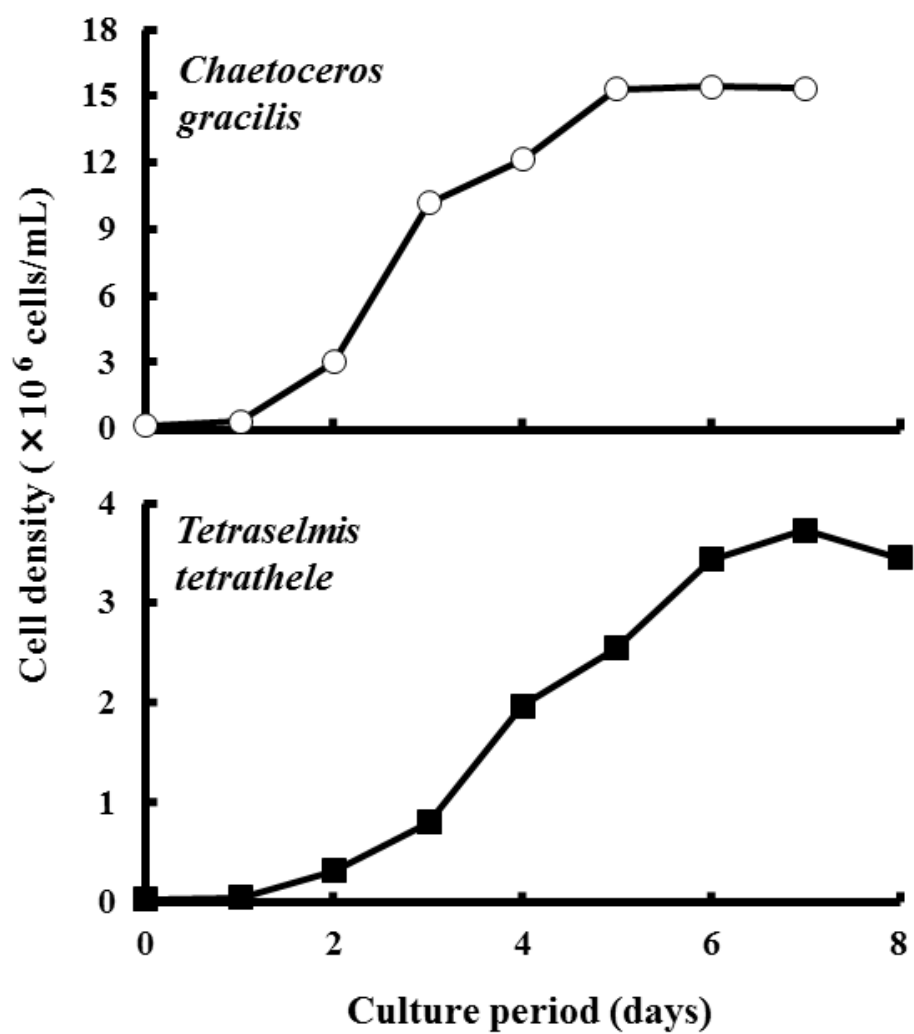


Fig. 1 Change in cell density of *Chaetoceros gracilis* and *Tetraselmis tetrathele* cultured in F medium during culture period.

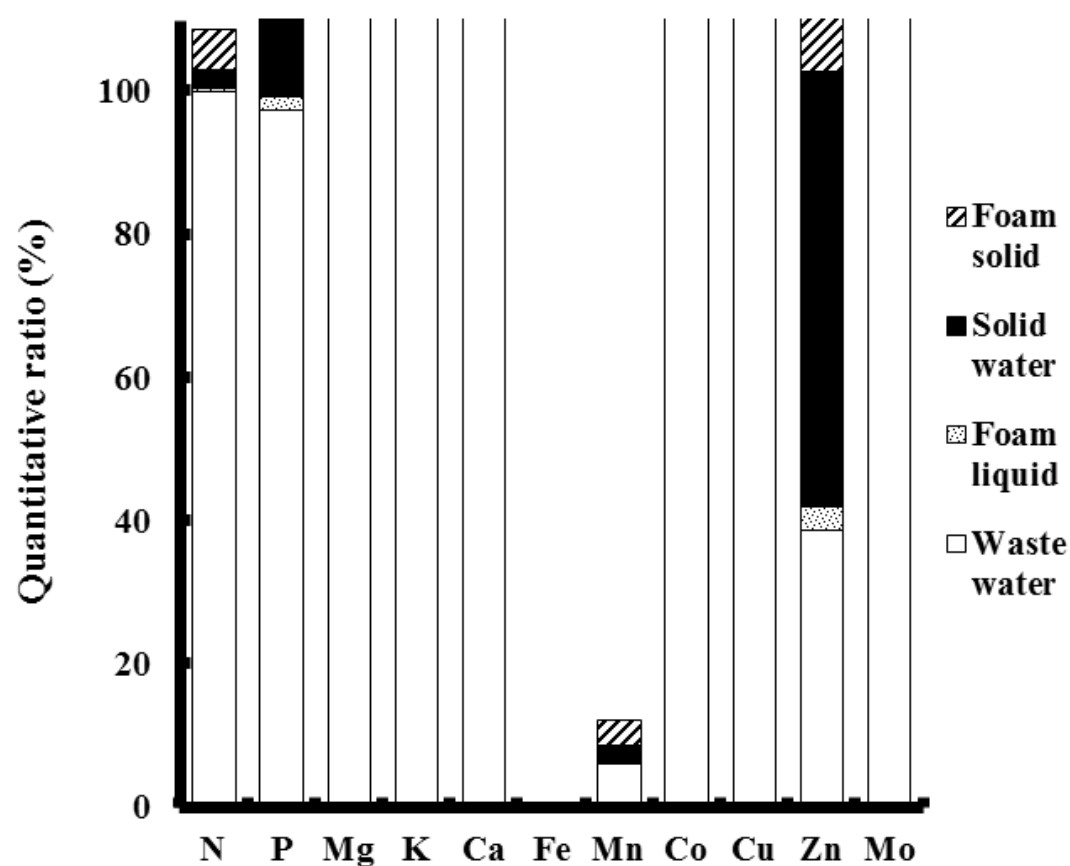


Fig. 2 Comparison of the nitrogen and mineral compositions of *Chaetoceros gracilis* cultured in F medium and aquacultural wastes from closed recirculating aquaculture system with tiger puffer based on nitrogen content of the algae and waste water.

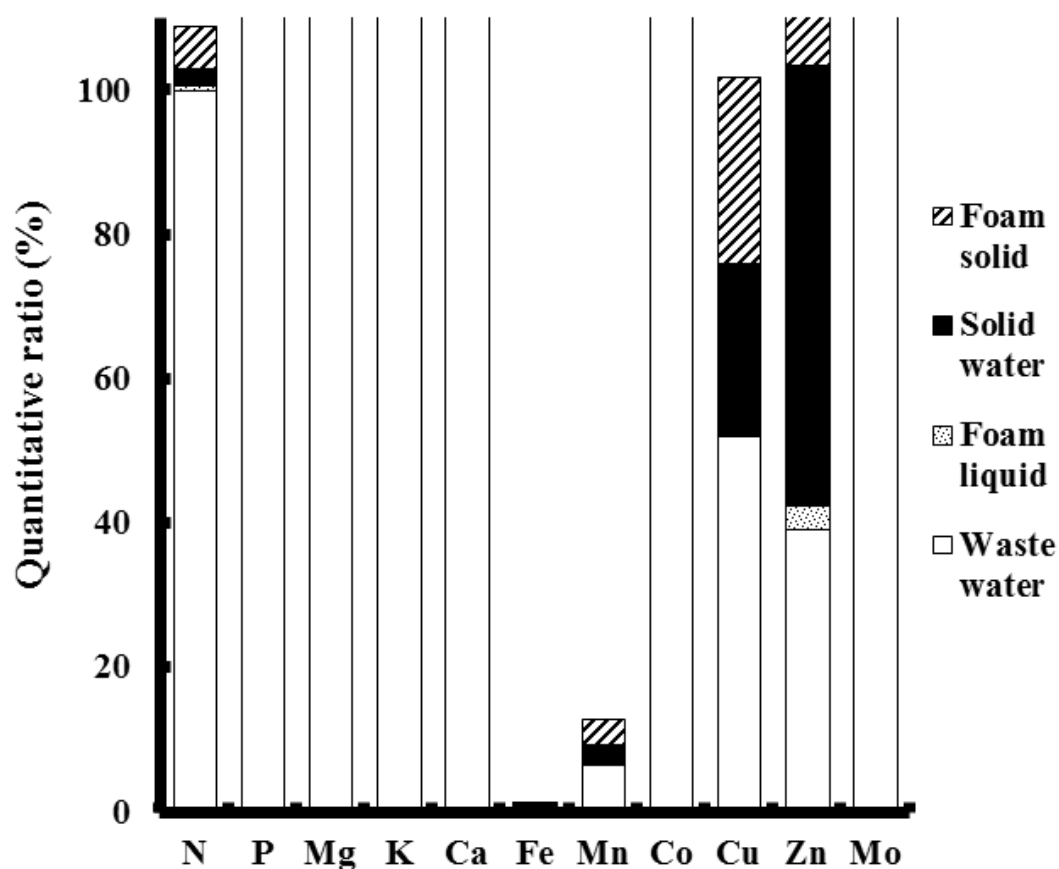


Fig. 3 Comparison of the of the nitrogen and mineral compositions of *Tetraselmis tetrathele* cultured in F medium and aquacultural wastes from closed recirculating aquaculture system with tiger puffer based on nitrogen content of the algae and waste water.

Table 1 Initial and final cell density, dry weight, and specific growth rate of *Chaetoceros gracilis* and *Tetraselmis tetrathele* in the 7 and 8 /days culture with F medium

		Initial	Final	Specific growth rate (%)
Cell density ($\times 10^5$ cells/mL)	<i>C. gracilis</i>	1.49 ± 0.18	153.17 ± 43.6	57.59
	<i>T. tetrathele</i>	0.32 ± 0.08	30.19 ± 17.45	50.55
Dry weight (mg/L)	<i>C. gracilis</i>	6.57 ± 0.20	925.7 ± 63.78	59.29
	<i>T. tetrathele</i>	9.05 ± 0.27	1125.7 ± 60.95	53.86

Table 2 Nitrogen and mineral composition (dry matter basis) of *Chaetoceros gracilis* and *Tetraselmis tetrathele* cultured in F medium

		<i>Chaetoceros gracilis</i>	<i>Tetraselmis tetrathele</i>
N	(mg/g)	29.92 ± 0.26	21.26 ± 0.12
P	(mg/g)	1.51 ± 1.11	1.77 ± 1.09
K	(mg/g)	21.33 ± 0.19	9.83 ± 0.29
Mg	(mg/g)	14.31 ± 0.40	5.65 ± 2.49
Ca	(mg/g)	3.37 ± 0.25	34.58 ± 0.08
Fe	(µg/g)	1117.87 ± 38.01	461.15 ± 17.62
Mn	(µg/g)	134.94 ± 3.01	92.08 ± 7.08
Co	(µg/g)	4.77 ± 1.40	4.17 ± 2.37
Cu	(µg/g)	5.36 ± 1.60	16.52 ± 7.57
Zn	(µg/g)	19.89 ± 2.53	14.08 ± 0.17
Mo	(mg/g)	5.12 ± 1.85	0.57 ± 0.02

Table 3 Nitrogen and mineral composition of waste water, foam liquid, solid waste, foam solid collected from closed recirculating fish culture system with *Takifugu rubripes* after the 70-/days rearing

		Waste water	Foam liquid		Solid waste	Foam solid
N	(mg/L)	381.9	237.7	(mg/g)	35.6	69.0
P	(mg/L)	18.8	41.9	(mg/g)	100.5	43.3
K	(mg/L)	608.4	520.7	(mg/g)	38.7	38.8
Mg	(mg/L)	1243.5	954.3	(mg/g)	7.9	13.8
Ca	(mg/L)	851.7	443.2	(mg/g)	188.7	73.7
Fe	(µg/L)	76.8	1859.7	(mg/g)	1.5	2.2
Mn	(µg/L)	106.0	149.2	(µg/g)	171.9	181.3
Co	(µg/L)	84.8	89.3	(µg/g)	49.6	47.1
Cu	(µg/L)	154.3	38.7	(µg/g)	111.5	146.7
Zn	(µg/L)	98.8	929.5	(µg/g)	580.8	675.2
Mo	(mg/L)	12.7	7.2	(µg/g)	3.2	1.2

第 2 章

養魚廃棄物を用いたキートセロスおよび

テトラセルミスの培養

キートセロスおよびテトラセルミスをはじめとする微細藻類は、必要とする元素のみを吸収し、その藻体の組成に反映させる。したがって、藻体組成に類似した元素割合の培地を作製することで培地からの効率的な栄養塩吸収と藻体の生産を同時に行うことが可能であると考えられる。そこで、第 1 章においては、本研究室の循環式養殖システムで飼育されたトラフグの飼育排水、沈殿物、泡沫分離装置内の液体および固形物の元素濃度および含有量とキートセロスおよびテトラセルミス藻体の元素含有量を飼育排水の窒素濃度とキートセロスおよびテトラセルミスの窒素含有量を同等として他の元素の比較を行い、藻体に対するトラフグ飼育廃棄物 4 種に含まれる元素濃度および含有量の割合を把握した。その結果、カリウム、マグネシウム、カルシウムおよびモリブデンは、飼育排水のみで藻体中の元素含有量を満たすことが分かった。また、リンおよび亜鉛は、その他の養魚廃棄物 3 種を混合することで藻体中の元素含有量を満たすことが可能であることが分かった。しかし、鉄およびマンガンは、養魚廃棄物 4 種を混合しても、藻体中の含有量を満たすことが出来ないことも分かった。したがって、鉄・マンガンは外部から添加する必要があることが示唆された。また、泡沫分離装置内の液体は、含有する元素に偏りがあり、他の 3 種

の養魚廃棄物へ混合しても藻体要求量を充足させることに寄与しないことが分かった。このことから、本章では、養魚廃棄物としてトラフグ飼育排水、沈殿物および泡沫分離装置内の固形物を利用し、実際に養魚廃棄物培地を作製し、合成培地である F 培地 (Guillard and Ryther, 1963; Guillard, 1975) と増殖率を比較した。また、栄養塩除去率がどの程度であるかを把握した。さらに不足元素である鉄・マンガンについては、添加効果を調査した。

材料および方法

供試藻類

キートセロスおよびテトラセルミスは第 1 章第 1 節で培養したものと同じく、独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所養殖技術部から分与されたものを F 培地で予備培養したものを用いた。なお、F 培地の組成は、第 1 章第 1 節の方法に準じて作製した。

養魚廃棄物

培地に使用したトラフグ養魚廃棄物のうち飼育排水は、本学の閉鎖循環式養殖システムを用いて、70 日間トラフグを飼育した後の排水を回収し、塩酸を 0.1% の割合で添加し、保存したものを用いた。また、泡沫分離装置内の固形物および沈殿物は、遠心分離機 (SPX-201, トミー工業(株)) を用いて回収し、回収後凍結乾燥機 (FDU-506, 東京理化機器(株)) で乾燥を行ったものを使用した。

培地の作製

培養は、1) 試験区を希釈して使用した飼育排水区、2) 飼育排水に沈殿物と泡沫分離装置内の固形物 (以下、泡沫固体と表

記)を硫酸分解後、混合した養魚廃棄物区、3) 養魚廃棄物区に塩化鉄(Ⅲ)・六水和物をキートセロスおよびテトラセルミス藻体組成と比較して培地に不足する量を添加した養魚廃棄物+Fe区、4) 養魚廃棄物区に塩化マンガン(Ⅱ)・四水和物をキートセロスおよびテトラセルミス藻体と比較して培地に不足する量を添加した養魚廃棄物+Mn区、5) 鉄源・マンガン源の両方を添加した養魚廃棄物+Fe+Mn区、6) 通常の藻類培養に用いられるF培地を藻体中窒素含有量と同等になるように濃縮調整したF培地区の計6区で行った。なお、基準にした藻体中の窒素含量はそれぞれの藻体が乾燥重量当たり 1g/L 存在した際に含まれる窒素量とした。

作製した培地は、保存用の塩酸、酸分解用の硫酸により作製後は酸性であるため、培養には適さない。そこで、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウムおよび水酸化マグネシウムの強塩基 4 種で海水組成を模した強塩基混合液を作製し、pH が 7.5~7.9 となるように中和を行った。pH の計測には、pH メーター(セブンマルチ S47, メトラートレド(株))を使用した。作製した培地は、高圧滅菌器(HA-300MD, (株)平山製作所)を用いて、121℃、2 気圧で 20 min、高圧蒸気滅菌処理を行った。それぞれの培地の作製の手法は、キートセロスは Fig. 4 に、テトラセルミスは Fig. 5 にそれぞれ示す。

培養装置および培養条件

F培地で予備培養した藻体を、各培地に 10mL/L の割合で接種し、接種時キートセロスおよびテトラセルミスそれぞれの藻体密度は、細胞密度 1.12×10^5 cells/mL、乾燥重量 6.36mg dry weight / L および

細胞密度 0.58×10^5 cells/mL、乾燥重量 9.72mg dry weight / L であった。

培養には、500 mL ガラスフラスコ(柴田科学(株))を用いて培養液の量は 500mL とした。通気による細菌のコンタミネーションを防ぐため、吸気口に PTFE メンブレン装着フィルターユニット(Millex® FH50、日本ミリポア(株))、排気口にシリコン栓(C-30、信越ポリマー(株))を取り付け、無調整空気を 1 L/min の割合で通気した。光源には白色蛍光灯(FL40SS-W/37、東芝(株))を用い、平均光合成有効光量子束密度(以下、PPFD と表記)が $258.3 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 、12 時間明期:12 時間暗期(以下、12L:12D と表記)の光周期において下方から上方へと照射した。培養時の温度は $27.8 \pm 0.1^\circ\text{C}$ であった。培養は 3 反復で行った。

藻体回収

前日の細胞数よりも減少もしくは停滞傾向が見られた時点で培養を終了し、遠心分離機(SPX-201、トミー工業(株))により藻体を回収した。回収後、 -20°C の冷凍庫で予備凍結し、凍結乾燥機(FDU-506、東京理化機器(株))により凍結乾燥を行った。

分析方法

【比増殖率の把握】細胞計数法および乾燥重量法により比増殖率を求めた。細胞計数は培養中、培養フラスコに備え付けたサンプリングチューブより 1mL ずつ、シリンジを使用してサンプリングし、トーマの血球計算板により毎日細胞数を計測し、藻体を回収する前の細胞数を最終の細胞数とした。なお、サンプリングを行う前に、前回のサンプリングと蒸発により減少した培養液を蒸留水で補充し、培地が常に 500 mL になるように調整した。乾燥重量は、培養

前後に遠心分離により回収し、凍結乾燥を行った後、秤量した。増殖率の算出は第 1 章第 1 節で用いた式 1 で行った。

【作製培地の組成および培養終了時の培地組成の把握】 全窒素は、全有機炭素計に付随する全窒素ユニットにより測定を行った。その他の元素(リン、カリウム、マグネシウム、カルシウム、マンガン、鉄、コバルト、銅、亜鉛およびモリブデン)の測定には、誘導結合プラズマ発光分析装置を用いた。pH は pH メーターを用いてガラス複合電極法により測定を行った。

【藻体組成の把握】 凍結乾燥を行った藻体は、分析に用いる前に酸による分解を行った。分解には、マイクロウェーブ試料分解装置 (Model 7295)を使用した。乾燥試料 0.15 g に対して濃硫酸(97%)を 3 mL 加えて 175℃で 10 分、マイクロ波加熱処理を行い、その後 15 % の過酸化水素を 3 mL 加え、125℃で 5 分間マイクロ波加熱処理を行った。処理後の試料は脱イオン水で 100mL に定容した。

【栄養塩除去率】 培養による水質浄化の検証を行うために、次の式により栄養塩除去率を求めた。

$$NR = (NCf \times Vn + NCi \times Vi - NCf \times Vf) / (NCf \times Vn + NCi \times Vi) \times 10 \quad (2)$$

NR : 栄養塩除去率 (%)

NCf : F 培地中の栄養塩濃度 (mg/L)

Vn : 接種藻体懸濁液量 (L)

NCi : 実験開始時の培養液中の栄養塩濃度 (mg/L)

Vi : 実験開始時の培養液量 (L)

NCf : 実験終了時の培養液中の栄養塩濃度 (mg/L)

Vf : 実験終了時の培養液量 (L)

【統計処理】 乾燥重量、比増殖率について、それぞれの試験区間での有意差を Tukey の多重比較により有意水準 5% を基準に評価した。

結 果

作製した培地の組成

作製したキートセロスの培地組成を Table 4 に、テトラセルミスの培地組成を Table 5 に示す。各試験区において全窒素は参考にしたキートセロスおよびテトラセルミス藻体中濃度は 29.9 mg-N/L および 21.3 mg-N/L であり、作製した培地のいずれにおいてもこれらに近い値を示した。沈殿物および泡沫固体は濃硫酸による酸分解を行った後に培地に用いたため、飼育排水区と比較して全態窒素、マグネシウム、および亜鉛の値が若干高くなった。マグネシウム、亜鉛およびリンは飼育排水区と比較すると沈殿物と泡沫固体を混合することで高い値となった。養魚廃棄物+Fe 区、養魚廃棄物+Mn 区および養魚廃棄物+Fe+Mn 区ではそれぞれ鉄、マンガンがキートセロスおよびテトラセルミス藻体中に含まれる元素濃度とほぼ等しい値で添加することができ、pH は、概ね 7.5~7.9 の間に調整することが出来た。結果として、目標とした値に概ね則した培地を作製することが出来た。

増殖率

キートセロス培養 11 日目の藻体増殖の状態を Fig. 6 に示す。それぞれの培地で細胞密度に差異はあるが、増殖が確認された。培養期間中における増殖曲線を Fig. 7 に示す。F 培地区は培養 2 日目から増殖が確認され、培養 6 日目に最高密度 1.11×10^7 cells/mL の細胞

数に達し、培養 7 日目から細胞数の減少が確認されたので培養を終了した。培養 5 日目から、養魚廃棄物+Fe+Mn 区を除く 4 試験区において増殖が確認された。飼育排水区、養魚廃棄物+Fe 区および養魚廃棄物+Mn 区は培養 9 日目にそれぞれ 4.2×10^6 cells/mL、 6.6×10^6 cells/mL および 6.29×10^6 cells/mL の細胞数に達し、培養 11 日目に細胞数の減少が確認されたので培養を終了した。養魚廃棄物区は培養 11 日目に 5.43×10^6 cells/mL の細胞数に達し、培養 12 日目に細胞数の減少が確認されたので培養を終了した。養魚廃棄物+Fe+Mn 区は、培養 7 日目に増殖が確認され、培養 12 日目に、 8.16×10^6 cells/mL の細胞数に達し、培養 14 日目に細胞数の減少が確認されたため、培養を終了した。

テトラセルミスの培養 7 日目の藻体増殖の状態を Fig. 8 に示す。飼育排水区を除くそれぞれの培地で目視による差異は認められず、十分な増殖が確認された。培養における増殖曲線を Fig. 9 に示す。培養 7 日目まで飼育排水区を除く 5 区において十分な増殖が得られた。F 培地区、養魚廃棄物区、養魚廃棄物+Fe 区、養魚廃棄物+Mn 区および養魚廃棄物+Fe+Mn 区は培養 7 日目にそれぞれ最高密度 3.02×10^6 cells/mL、 2.95×10^6 cells/mL、 3.28×10^6 cells/mL、 3.13×10^6 cells/mL および 3.3×10^6 cells/mL の細胞密度に達し、培養 8 日目から細胞数の減少が確認されたので培養を終了した。飼育排水区は培養 9 日目に 1.11×10^6 cells/mL の細胞数に達し、培養 10 日目に細胞数の減少が確認されたため、培養を終了した。

培養終了後、藻体は遠心分離機により回収し、凍結乾燥を行った後、乾燥重量を算出した。キートセロスの乾燥重量測定結果および比増殖率について Table 6 に示す。藻体回収時のキートセロスの乾

乾燥重量は F 培地区で最も高い値 1068.5mg/L を示した。次いで養魚廃棄物+Fe+Mn 区が 945mg/L、養魚廃棄物+Fe 区が 718mg/L、養魚廃棄物+Mn 区が 714 mg/L を示した。養魚廃棄物区および飼育排水区はそれぞれ 710 mg/L と 644 mg/L であった。培養日数の短かった F 培地区において比増殖率は、56.9%/day と最も高い値を示した。一方、乾燥重量において高い値を示した養魚廃棄物+Fe+Mn 区では、培養期間の長期化により増殖率は 33.3 %/day と最も低くなった。同時期に培養を終了した飼育排水区、養魚廃棄物区、養魚廃棄物+Fe 区、および養魚廃棄物+Mn 区ではそれぞれ 38.5%/day、39.3%/day、39.4%/day、 および 39.3%/day となり、ほぼ同等の値であった。

テトラセルミスの乾燥重量測定結果および比増殖率について Table 7 に示す。テトラセルミスでは養魚廃棄物+Fe+Mn 区で最も高い乾燥重量 927mg/L を示した。次いで養魚廃棄物+Mn 区が 890mg/L、養魚廃棄物+Fe 区が 890mg/L、養魚廃棄物区が 846mg/L、F 培地区が 841mg/L、飼育排水区が 334 mg/L の値を示した。飼育排水区以外の 5 試験区の培養終了時の乾燥重量に有意差は認められなかった($p>0.05$)。テトラセルミスで養魚廃棄物と鉄およびマンガンを追加した養魚廃棄物区、養魚廃棄物区+Fe、養魚廃棄物+Mn 区および養魚廃棄物+Fe+Mn 区の 4 区において F 培地区と同時期に培養を終了した。比増殖率はそれぞれ 44.7%/day、45.2%/day、45.2%/day、 および 45.6%/day であり、F 培地区の 44.6%/day と比較し、同等の値であった。飼育排水区では増殖が他の試験区よりも劣る結果となったため、比増殖率も 35.4%/day と低い値であった。

藻体組成

各種培地で培養したキートセロスの藻体組成を Table 8 に示す。

窒素含量は F 培地で培養したキートセロスと同等の値を示した。養魚廃棄物を用いた養魚廃棄物区、養魚廃棄物+Fe、養魚廃棄物+Mn 区および養魚廃棄物+Fe+Mn 区の 4 区ではリンおよびマグネシウムの含量が他の試験区と比較して高い値を示した。また、鉄を添加した区では添加しない区と比較して概ね 20 倍の含有量を示し、F 培地で培養した藻体よりも高い値を示した。マンガンを添加した区においては添加しない区と比較して概ね 2 倍の含有量を示し、F 培地で培養した藻体と同等の含有量を示した。

テトラセルミスも同様に窒素は F 培地で培養した藻体と同等の値を示した。養魚廃棄物を用いた 4 区ではリンの含量が若干高い値を示した。鉄を添加した養魚廃棄物+Fe および養魚廃棄物+Fe+Mn 区では他の試験区と比較し、2 倍程度の含量を示し、マンガンを添加した養魚廃棄物+ Mn 区および養魚廃棄物+Fe+Mn 区では他の試験区よりも 2~4 倍の含量を示した。この結果から養魚廃棄物に鉄とマンガンを添加することにより、F 培地で培養した藻体と同様の鉄およびマンガンを含む藻体が得られることが分かった。

栄養塩除去率

植物に必要な三大元素、窒素、リンおよびカリウムに着目し、作製培地および培養終了後の培地組成により算出した栄養塩除去率についてキートセロスの結果を Fig. 10 に、テトラセルミスの結果を Fig. 11 にそれぞれ示す。

キートセロスでは全試験区において 75%以上の窒素除去率および 85%以上のリン除去率であった。F 培地と比較しても他の試験区では同等かそれ以上の窒素リン除去率が得られた。カリウムの除去率に関しては養魚廃棄物+Fe+Mn 区の 16.4%が最も高かったが、窒

素およびリンの除去率と比較すると低い結果となった。また、F 培地区のカリウム除去率は 6.0%と最も低くなった。

一方、テトラセルミスの窒素除去率は最も値の低かった飼育排水区(54.8%)を除き、概ね 85%程度の除去率であった。リンの除去率は全ての試験区で 100%となった。カリウムの除去率については F 培地区の 5.32%を除き、5%を下回って低い値となった。

考 察

キートセロスは飼育排水(塩酸で保存)および固形物(沈殿物と泡沫固体を硫酸で分解)を添加した試験区においては培養初期の全体的な増殖速度が F 培地区より劣るという結果となった。その上、養魚廃棄物+Fe+Mn 区では増殖速度が他の 4 試験区よりも劣るという結果となった。その要因として培地中に多量に含まれる塩化物イオンおよび硫化物イオンが影響していることも考えられる。養魚廃棄物+Fe+Mn 区においては培養の結果から他の試験区の増殖と比較し、遅延が生じた(Fig. 8 および Table 6)。この増殖の遅れは、塩化物イオンおよび硫化物イオンに加え、塩化鉄(Ⅲ)・六水和物および塩化マンガン(Ⅱ)・四水和物の直接的な添加が要因であると考えられる。この鉄およびマンガンの添加においてはキレート等を使用することにより、栄養塩の利用阻害を防止することも検討する必要がある。

テトラセルミスの増殖は飼育排水区を除いて、その他の 4 試験区は乾燥重量および細胞密度の双方において合成培地である F 培地区と比較し、大きな差異はなかったが、養魚廃棄物+Fe 区、養魚廃棄物+Mn 区、および養魚廃棄物+Fe+Mn 区の 3 区では F 培地区により乾燥重量および細胞密度において高い値を示した(Fig. 9 および

Table 7)。このことから養魚廃棄物培地によるテトラセルミスの培養は十分に可能であることが示唆された。

また、キートセロスおよびテトラセルミスの栄養塩除去率については養魚廃棄物を用いた 4 試験区で概ね窒素で 80%、リンで 90%の除去率が得られ、テトラセルミスではリンの除去率は全試験区で 100%となった。一方、カリウムの除去に関してはキートセロスで 10~15%程度、テトラセルミスでは 5%以下であり、低い値となった (Figs. 10 および 11)。

このことから、養魚廃棄物中の窒素・リンの栄養塩除去に関しても十分な効果が得られることが示唆された。カリウムについては飼育水中に多量に含まれており、閉鎖循環式養殖システムで水産生物を飼育する際にも必要な物質であるため、完全な除去は必要ない。

キートセロス培養時の不足元素添加区において、養魚廃棄物+Fe 区と養魚廃棄物+Mn 区では増殖は確認され、鉄およびマンガンを追加しない養魚廃棄物区よりも若干早い増殖を示した (Fig. 8)。しかし、F 培地区の回収時バイオマスと比較すると、低い乾燥重量および細胞密度であった。一方、養魚廃棄物+Fe+Mn 区においては、培養初期の増殖速度は劣っていたが、最終的な乾燥重量および細胞密度は F 培地区を除いて最も高い値を示した。このことより、鉄とマンガンそれぞれの単体添加に効果が認められ、鉄およびマンガンの併用添加にもバイオマス回収の観点からは効果があると考えられる。

テトラセルミスでは飼育排水区を除いて、その他の 4 試験区は乾燥重量および細胞密度の両方で合成培地である F 培地区と比較し、大きな差異は認められなかった (Fig. 9 および Table 7)。このため、藻類の増殖速度においては鉄およびマンガンの添加には効果を認

められなかった。

Okauchi, M. and Kawamura, K. (1997)はテトラセルミス *T. tetrathele* の大量培養における培地の検討結果について報告しており、ある特定の元素を不足させた培地で培養を行い、その影響について調査している。その結果、窒素(硝酸態)、リン(ナトリウム塩)、鉄(EDTA)、マンガン(塩化物)の順で増殖に影響が生じると報告している。本研究では不足すると考えられた鉄およびマンガンの添加を行わずとも培養が可能であった。これは養魚廃棄物に増殖に必要な鉄とマンガンが含まれていたことを意味するものである。しかし、藻体の餌料としての有効利用を考慮すると F 培地で培養した藻体と同程度の鉄とマンガンが含有されていることが望ましいと考えられる (Table 9)。

培養の結果を受けて、第 3 章では最も増殖成績が良好であった養魚廃棄物+Fe+Mn 培地と合成培地の F 培地を用いてキートセロスとテトラセルミスを拡大培養し、培養終了後にそれぞれの藻体を回収し、種々の水産生物の餌として利用する観点から藻体の栄養分析を行うこととした。

小 括

第 2 章では実際に飼育排水と硫酸で可溶化した沈殿物を混合して培地を作製し、キートセロスおよびテトラセルミスの培養を行うとともに、不足元素である鉄およびマンガンの添加効果も調査した。

培養は飼育排水区、養魚廃棄物区、養魚廃棄物+Fe 区、養魚廃棄物+Mn 区、養魚廃棄物+Fe+Mn 区および対照区として F 培地区を設けた。キートセロスは細胞密度・乾燥重量において養魚廃棄物+Fe+Mn 区が他の区よりも高い値を示したが、最大密度に達するまでの期間が最も長くなった。一方、飼育排水区では最大密度が最も低かった。養魚廃棄物区でも培養は可能であったが、鉄やマンガンを添加した区の最大密度が高いことから、不足元素の添加効果が認められた。一方、テトラセルミスでは飼育排水区以外の区で F 培地と同等もしくはそれを上回る培養結果が得られた。しかし、不足元素を添加した区では添加しない区と比較し、若干高い藻体回収量が得られた。キートセロスおよびテトラセルミスの栄養塩除去率については養魚廃棄物を用いた 4 試験区で概ね窒素で 80%、リンで 90%の除去率が得られ、テトラセルミスではリンの除去率は全試験区で 100%となった。

このことから、養魚廃棄物中の窒素・リンの栄養塩除去に関しても十分な効果が得られることが示唆された。

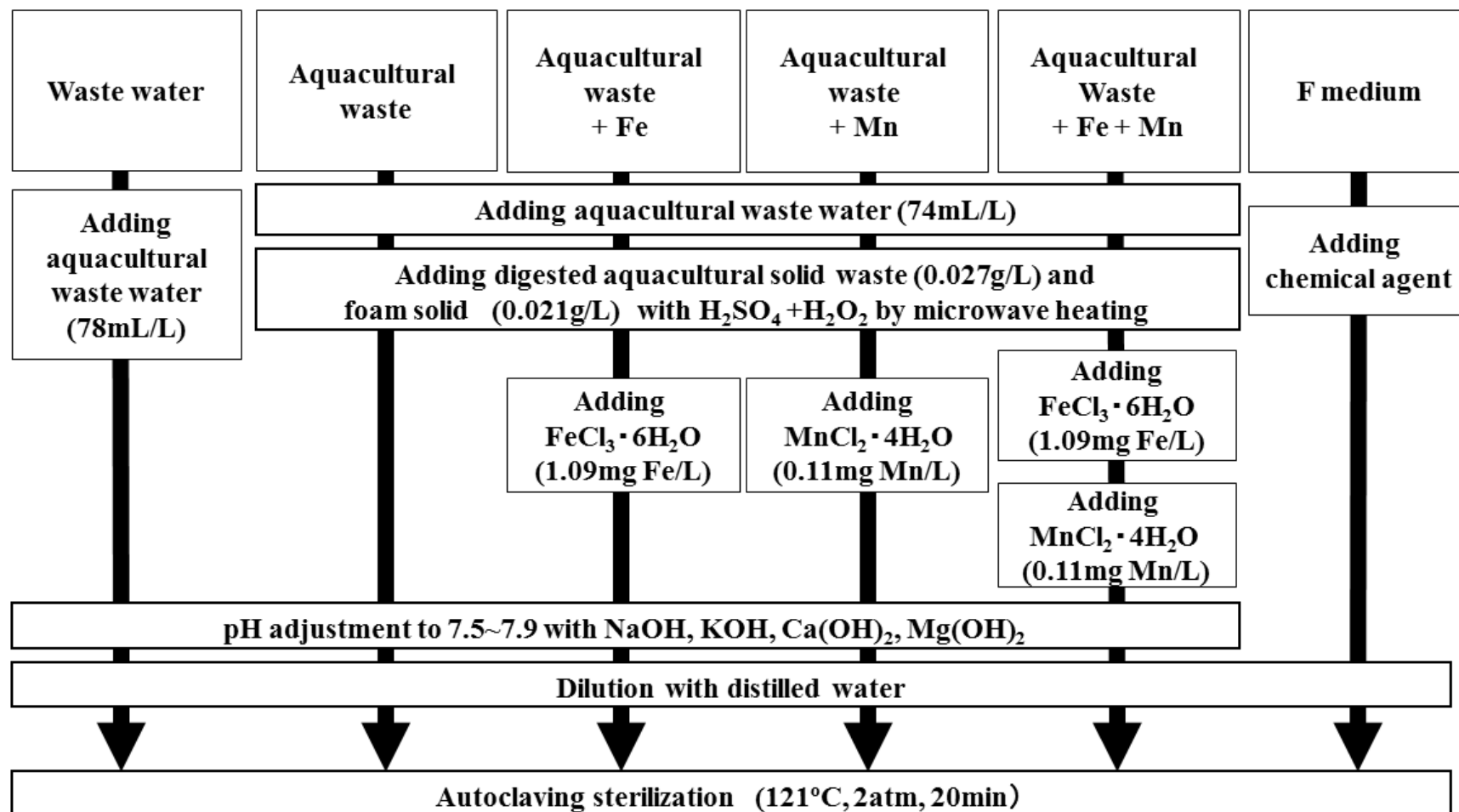


Fig. 4 Outline of the processing each aquacultural waste media and F medium for a culture experiment of *Chaetoceros gracilis*. Aquacultural waste: waste water + digested solid waste + digested foam solid, Fe: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Mn : $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

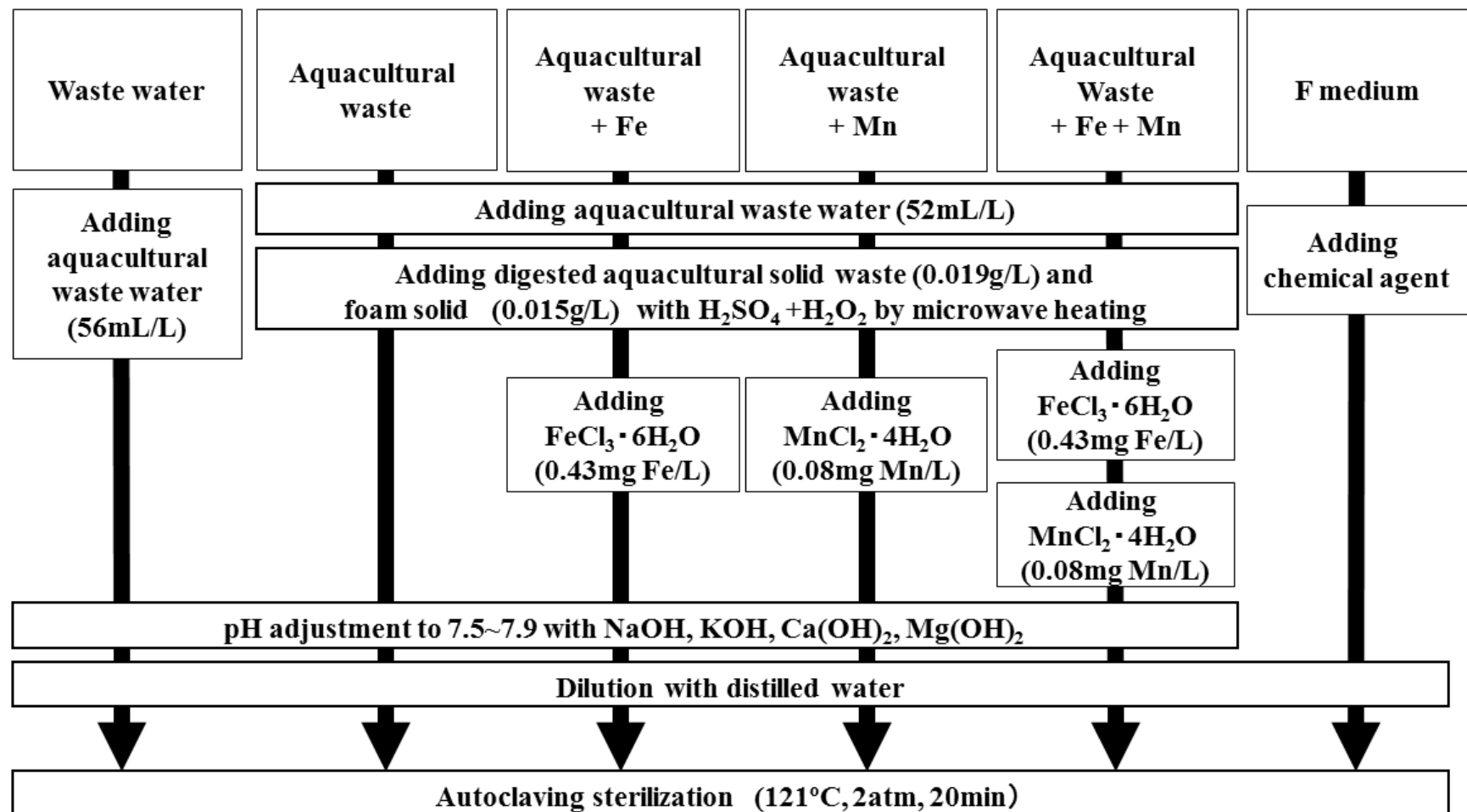


Fig. 5 Outline of the processing each aquacultural waste media and F medium for a culture experiment of *Tetraselmis tetrathele*. Aquacultural waste: waste water + digested solid waste + digested foam solid, Fe: FeCl₃ · 6H₂O, Mn : MnCl₂ · 4H₂O.

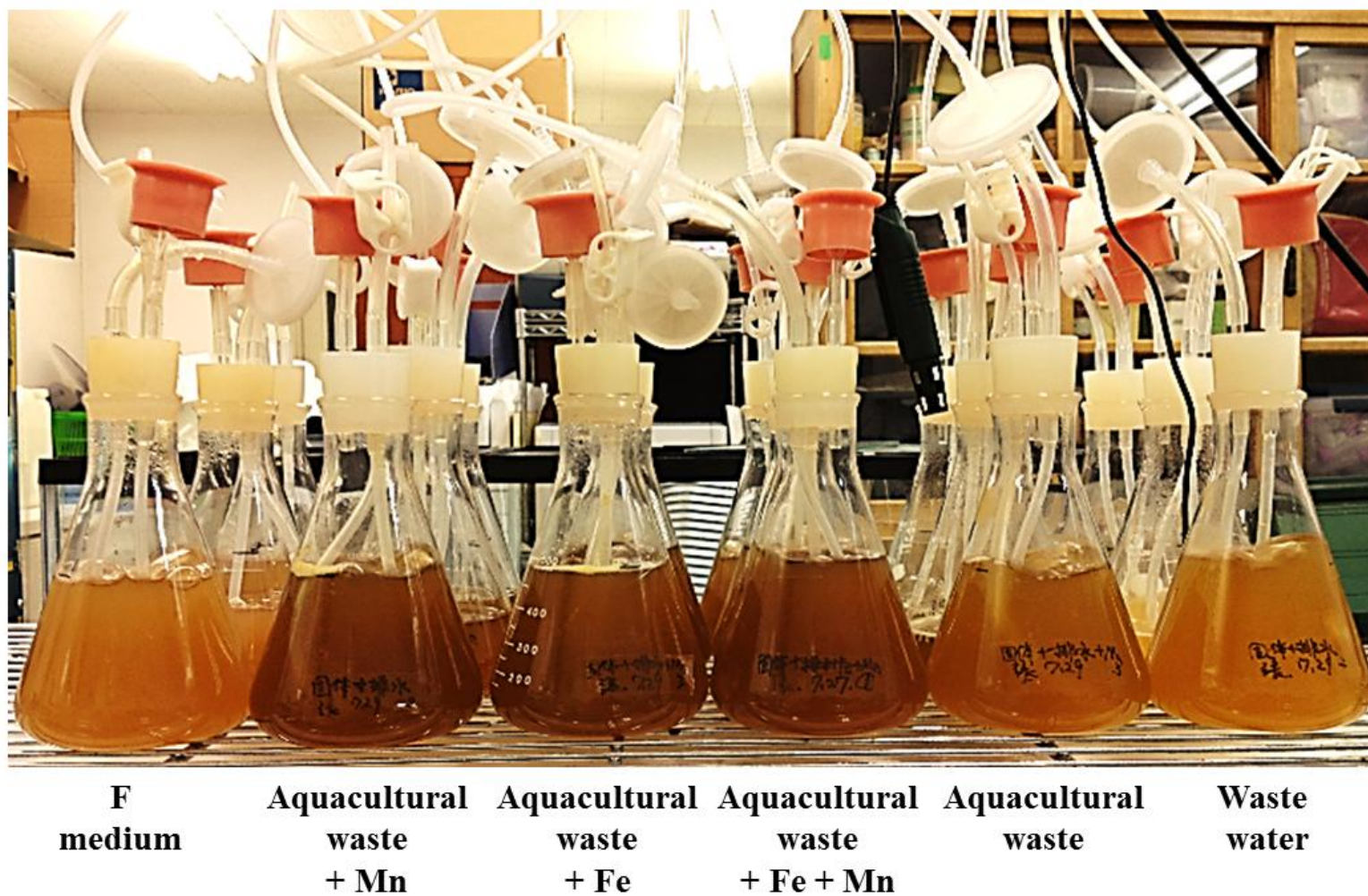


Fig. 6 Microalgae culture with *Chaetoceros gracilis* at the day 11 in each culture medium using aeration culture flasks.

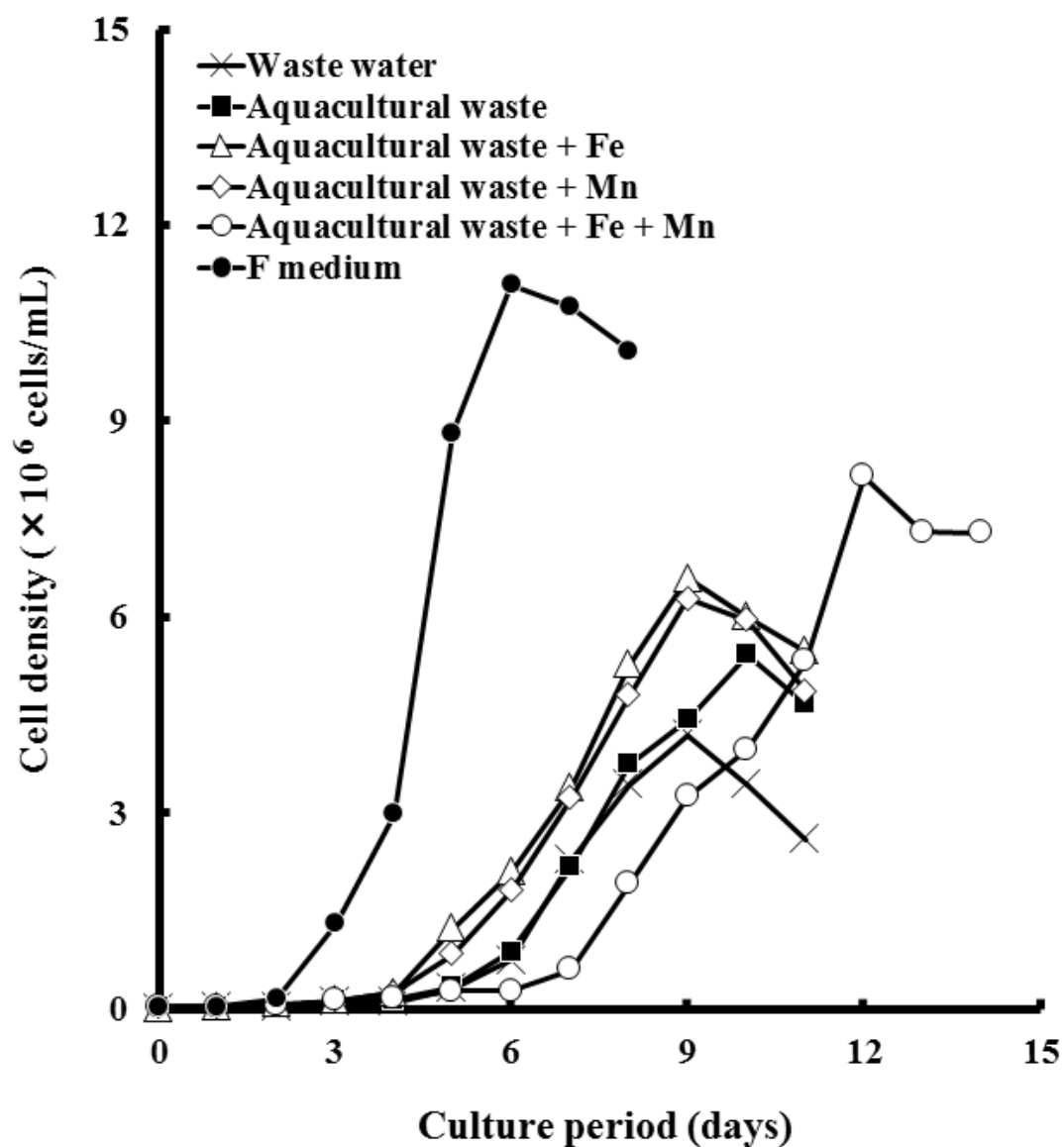


Fig. 7 Change in the cell density of *Chaetoceros gracilis* cultured in aquacultural waste media and F medium during culture period. Aquacultural waste: waste water + digested solid waste + digested foam Solid, Fe: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Mn: $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

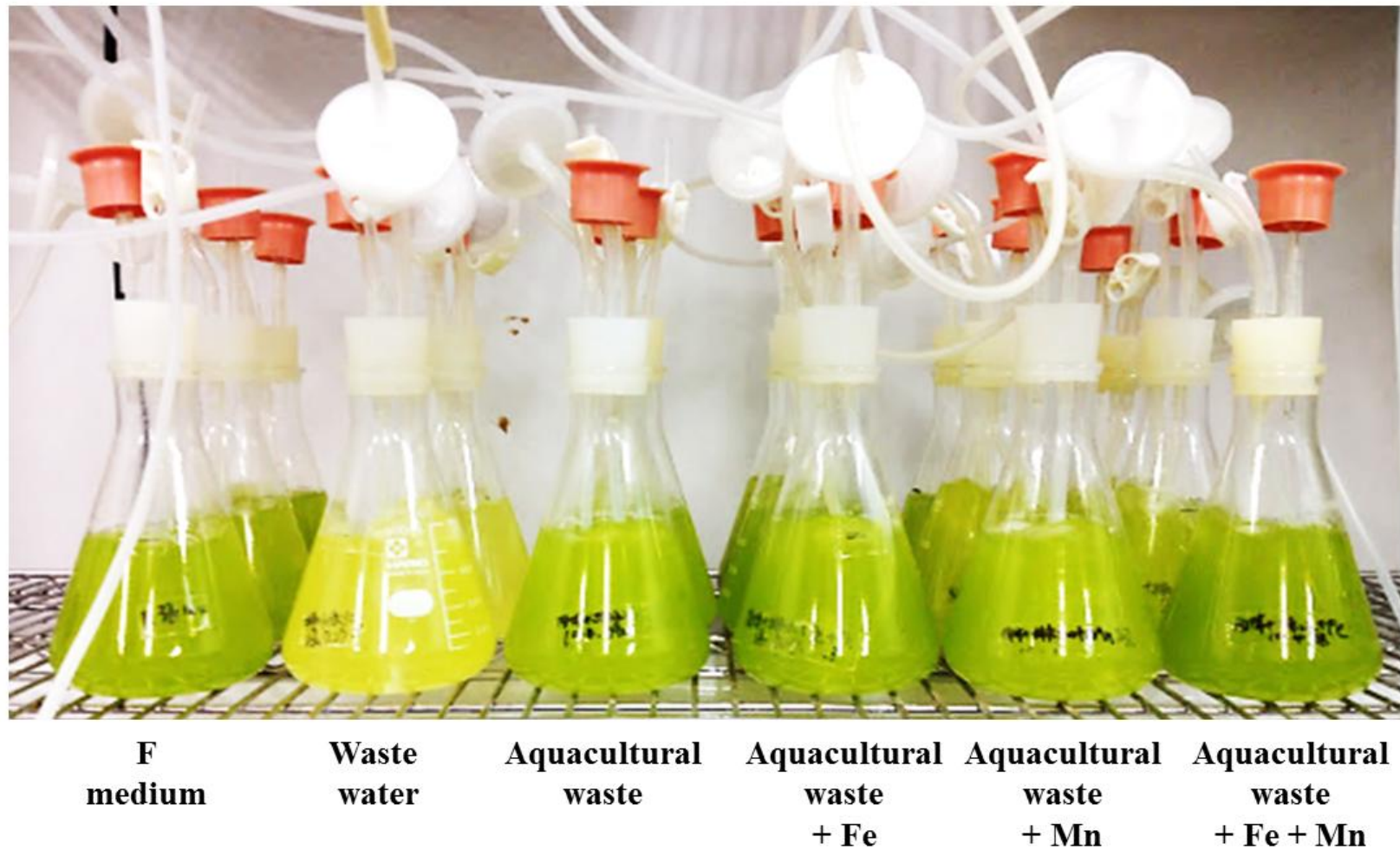


Fig. 8 Microalgae culture with *Tetraselmis tetrathele* at the day 7 in each culture medium using aeration culture flasks.

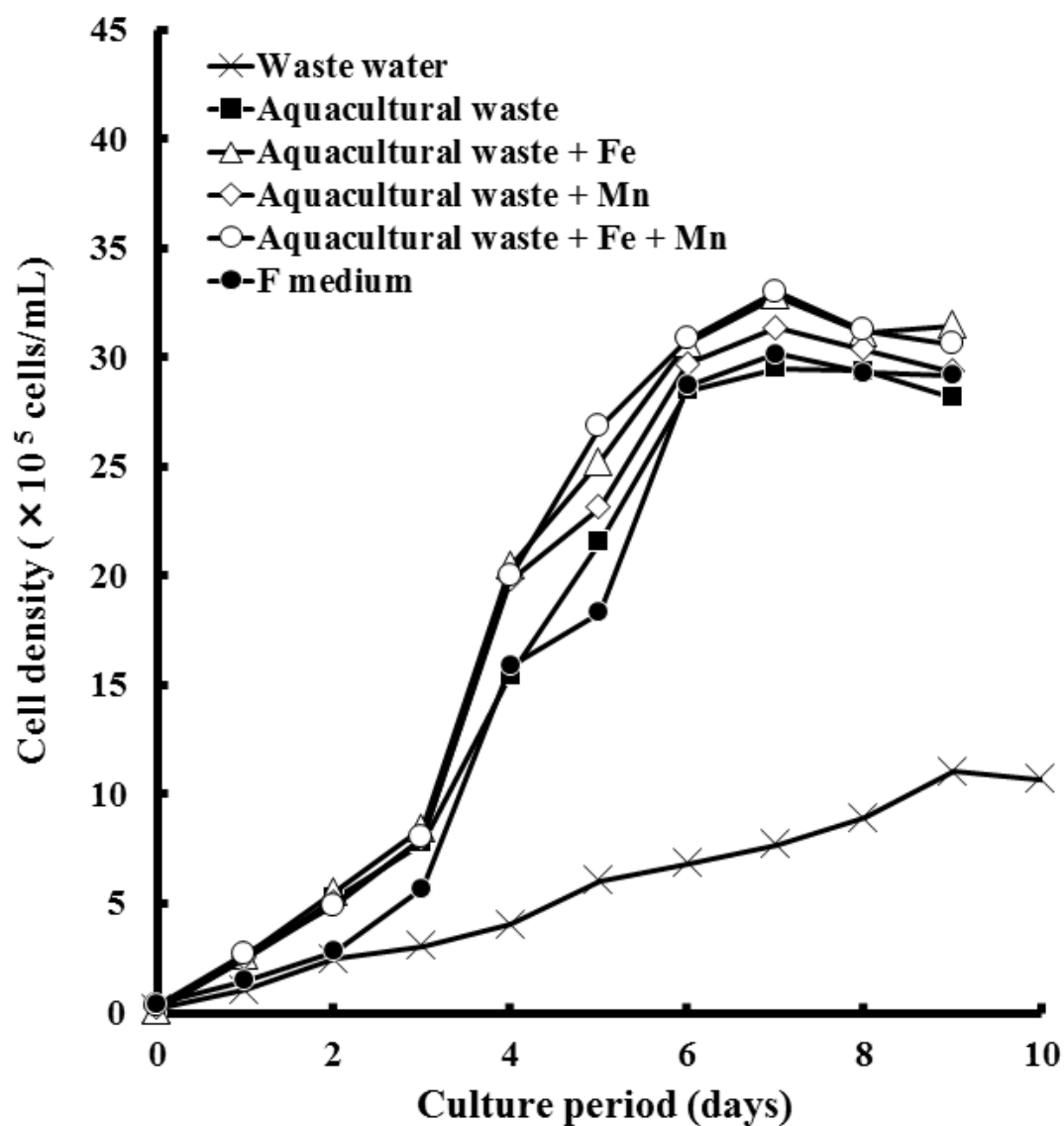


Fig. 9 Change in the cell density of *Tetraselmis tetrathele* cultured in aquacultural waste media and F medium during culture period. Aquacultural waste: waste water + digested solid waste + digested foam Solid, Fe: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Mn: $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

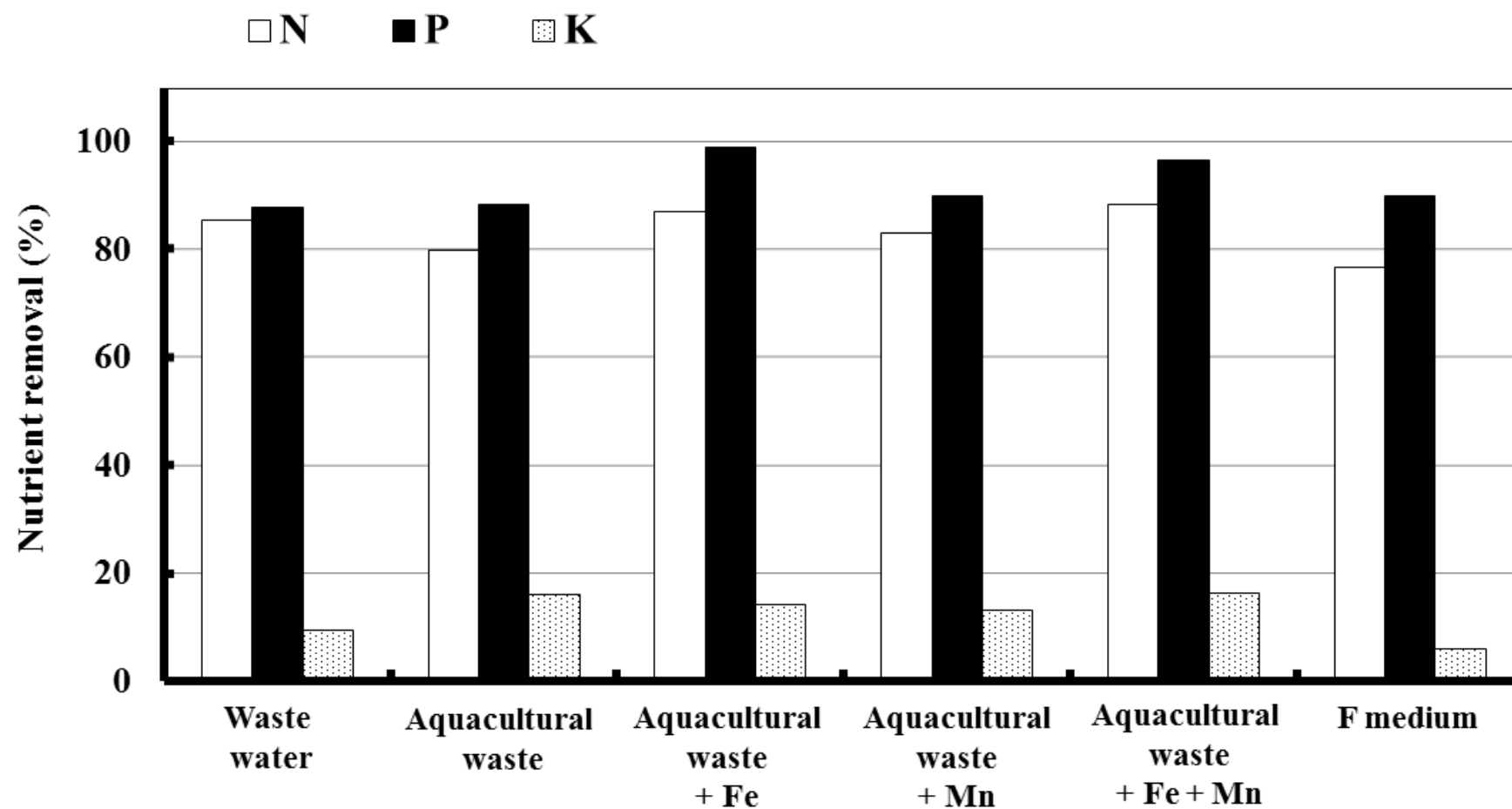


Fig. 10 Percentage of the nutrient removal by *Chaetoceros gracilis* from aquacultural waste media and F medium. Aquacultural waste : waste water + digested solid waste + digested foam solid. Fe: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Mn: $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

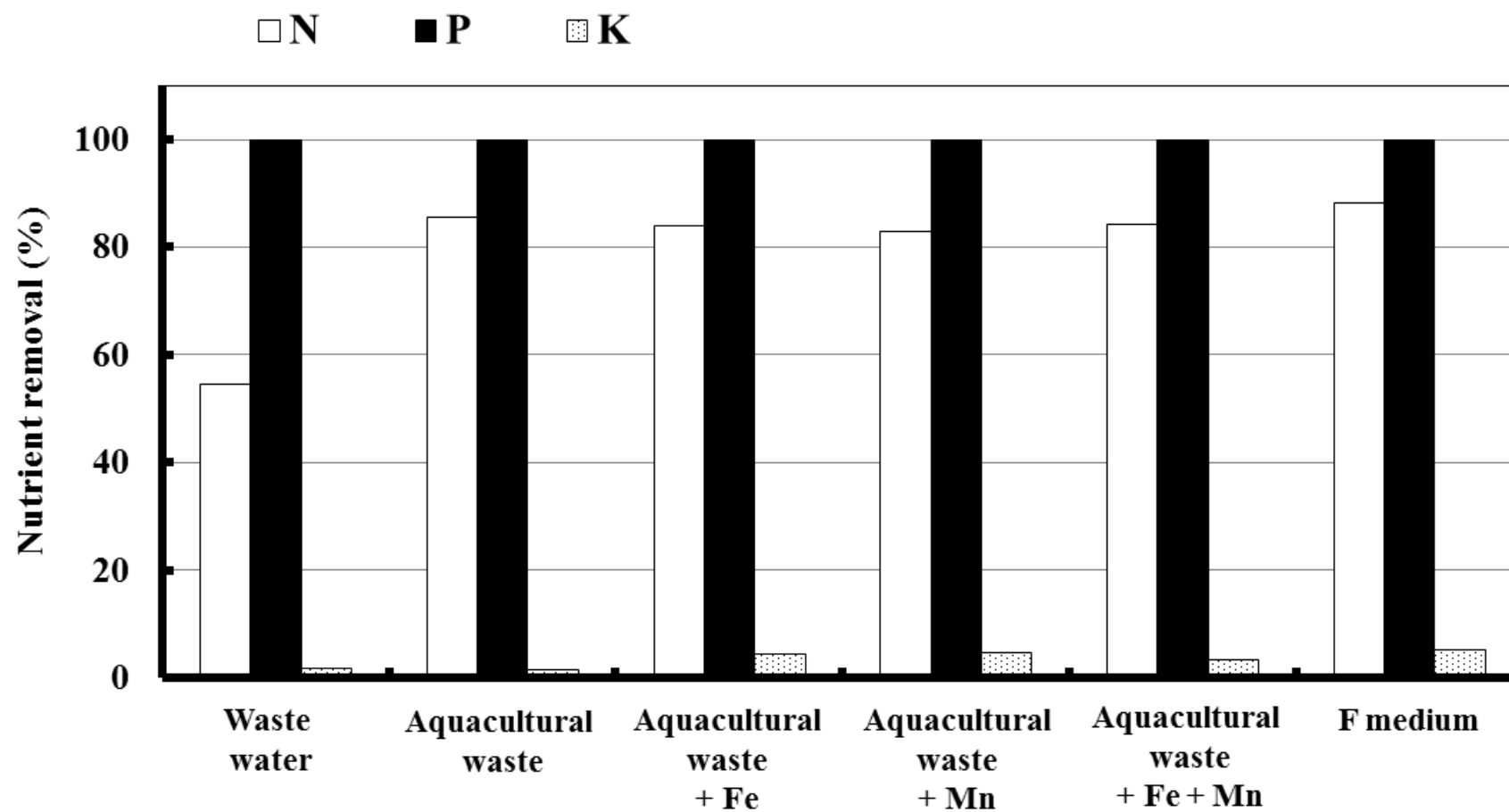


Fig. 11 Percentage of the nutrient removal by *Tetraselmis tetrathele* from aquacultural waste media and F medium. Aquacultural waste : waste water + digested solid waste + digested foam solid. Fe: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Mn: $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Table 4 Nutrient compositions of aquacultural waste media prepared from waste water, digested solid waste and foam solid, and F medium for the culture of *Chaetoceros gracilis*

		Waste water	Aquacultural waste	Aquacultural waste + Fe	Aquacultural waste +Mn	Aquacultural waste +Fe+Mn	F medium
N	(mg/L)	28.8	31.4	30.6	30.4	29.8	27.8
P	(mg/L)	3.5	3.1	3.2	2.8	3.1	2.3
K	(mg/L)	398.1	228.6	222.9	260.7	154.9	524.8
Mg	(mg/L)	682.2	738.5	729.3	703.7	710.8	708.6
Ca	(mg/L)	272.5	281.5	285.7	274.2	312.8	264.9
Mn	(µg/L)	11.0	22.0	22.0	120.9	107.5	98.9
Fe	(µg/L)	n.d.	n.d.	1224.5	20.6	1006.4	1110.1
Co	(µg/L)	n.d.	23.2	39.2	38.7	39.3	8.5
Cu	(µg/L)	n.d.	3.1	1.2	1.3	1.6	6.0
Zn	(µg/L)	n.d.	11.0	9.3	8.5	13.2	10.9
Mo	(mg/L)	5.8	6.3	5.6	6.8	8.1	9.5
pH		7.8	7.8	7.9	7.8	7.9	7.5
Salinity	(psu)	20.4	19.8	20.2	19.9	19.7	20.2

n.d. : not detected

Table 5 Nutrient compositions of aquacultural waste media prepared from waste water, digested solid waste and foam solid, and F medium for the culture of *Tetraselmis tetrathele*

		Waste water	Aquacultural waste	Aquacultural waste + Fe	Aquacultural waste +Mn	Aquacultural waste +Fe+Mn	F medium
N	(mg/L)	22.6	24.3	24.6	23.2	23.8	25.8
P	(mg/L)	1.5	2.5	2.7	2.8	3.0	2.3
K	(mg/L)	358.1	330.4	314.9	298.1	301.4	523.0
Mg	(mg/L)	602.6	627.5	683.3	676.2	621.2	711.8
Ca	(mg/L)	274.9	239.6	261.7	258.6	242.7	261.9
Mn	(µg/L)	11.4	44.9	57.5	113.6	101.1	98.9
Fe	(µg/L)	n.d.	n.d.	206.9	n.d.	134.8	1117.0
Co	(µg/L)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.9
Cu	(µg/L)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	5.2
Zn	(µg/L)	n.d.	11.2	23.0	11.4	10.5	10.5
Mo	(mg/L)	n.d.	4.7	5.3	5.3	5.0	9.4
pH		7.7	7.6	7.7	7.6	7.6	7.5
Salinity	(psu)	20.4	19.8	20.2	19.9	19.7	20.2

n.d. : not detected

Table 6 Initial and final measured dry weight of *Chaetoceros gracilis* cultured in aquacultural waste media and F medium

	Dry weight (mg/L)		Specific growth rate (%)
	Initial	Final	
Waste water		644 ^c	38.5
Aquacultural waste		710 ^b	39.3
Aquacultural waste + Fe	6.36	718 ^{bc}	39.4
Aquacultural waste + Mn		714 ^{bc}	39.3
Aquacultural waste + Fe + Mn		945 ^a	33.3
F medium		1069 ^a	56.9

Aquacultural waste : waste water + digested solid waste + digested foam solid, Fe: FeCl₃ • 6H₂O, Mn: MnCl₂ • 4H₂O.

Data represent mean ± S. D. (n=3)

Different alphabetical letter indicates significant difference among the treatments (Tukey's HSD test, $p < 0.05$).

Table 7 Initial and final measured dry weight of *Tetraselmis tetrathele* cultured in aquacultural waste media and F medium

	Dry weight (mg/L)		Specific growth rate (%)
	Initial	Final	
Waste water		334 ^b	35.4
Aquacultural waste		846 ^a	44.7
Aquacultural waste + Fe	9.72	890 ^a	45.2
Aquacultural waste + Mn		890 ^a	45.2
Aquacultural waste + Fe + Mn		927 ^a	45.6
F medium		841 ^a	44.6

Aquacultural waste : waste water + digested solid waste + digested foam solid, Fe: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Mn: $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.

Data represent mean \pm S. D. (n=3)

Different alphabetical letter indicates significant difference among the treatments (Tukey's HSD test, $p < 0.05$).

Table 8 Nitrogen and mineral compositions (dry matter basis) of *Chaetoceros gracilis* cultured in aquacultural waste media and F medium

	Waste water	Aquacultural waste	Aquacultural waste + Fe	Aquacultural waste + Mn	Aquacultural waste + Fe + Mn	F medium
N (mg/g)	30.57	30.73	28.99	31.13	31.07	29.92
P (mg/g)	1.82	5.52	5.76	6.43	7.64	1.51
K (mg/g)	20.51	20.86	21.29	23.77	23.22	21.33
Mg (mg/g)	8.20	11.44	14.11	11.05	11.87	14.31
Ca (mg/g)	3.55	4.30	4.95	4.47	3.06	3.37
Mn (µg/g)	19.57	46.58	59.66	126.18	179.26	134.94
Fe (µg/g)	29.35	67.68	1636.48	87.36	1603.34	1178.70
Co (µg/g)	4.85	4.76	4.91	5.11	5.04	4.77
Cu (µg/g)	2.93	1.86	1.71	1.94	2.10	5.36
Zn (µg/g)	9.78	7.45	5.97	4.85	4.98	19.89
Mo (mg/g)	6.85	4.66	6.82	6.80	5.98	5.12

Table 9 Nitrogen and mineral compositions (dry matter basis) of *Tetraselmis tetrathele* cultured in aquacultural waste media and F medium

	Waste water	Aquacultural waste	Aquacultural waste + Fe	Aquacultural waste + Mn	Aquacultural waste + Fe + Mn	F medium
N (mg/g)	26.26	23.22	21.79	21.87	21.68	21.27
P (mg/g)	2.60	3.15	3.71	2.99	3.18	1.77
K (mg/g)	9.53	8.27	7.92	8.33	8.00	9.83
Mg (mg/g)	4.24	4.74	4.64	4.52	4.46	5.65
Ca (mg/g)	35.78	39.94	36.87	35.23	34.37	34.58
Mn (µg/g)	40.18	20.66	21.65	85.95	71.69	92.08
Fe (µg/g)	45.68	57.96	567.89	39.33	409.24	461.15
Co (µg/g)	4.78	5.14	5.12	5.21	5.14	4.17
Cu (µg/g)	41.33	24.07	81.86	26.92	43.09	16.51
Zn (µg/g)	23.62	26.86	56.46	23.50	26.65	14.08
Mo (mg/g)	0.86	0.92	0.89	0.84	0.79	0.57

第 3 章

水産生物の初期餌料としての藻体の栄養分析

第 2 章の結果からキートセロスおよびテトラセルミス、養魚廃棄物を用いて培養可能であること、また、培地中からの窒素およびリンの回収が可能であること、キートセロスにおいては鉄およびマンガンの外部からの添加が増殖率の向上に有効であることを示した。実際に閉鎖循環式養殖システムの近傍に微細藻類の培養システムを併設し、閉鎖循環式養殖システムから排出される廃棄物を用いて培養を行う場合、回収された藻体を水産生物の餌料として利用するにはその栄養成分がこれまで用いられている合成培地での培養藻体と等しい、もしくは優れている必要がある。実際には様々な用途が考えられ、微細藻類を直接水産上有用な生物へ供給する (Nevejan et al., 2003; Ronquillo et al., 1997)、あるいは水産生物の餌となる動物プランクトンに供与することも考えられる (福所ら, 1984; 1985)。

そこで本章では最も増殖成績が良好であった養魚廃棄物 + Fe + Mn 培地と F 培地を用いてキートセロスとテトラセルミスの拡大培養を行い、藻体を回収して栄養分析を行い、養魚廃棄物から生産された藻類が餌として利用可能であるか否かについて評価を行った。

材料および方法

培養方法

キートセロスおよびテトラセルミスは第 1 章第 1 節で培養したも

のと同じく、独立行政法人水産総合研究センター増養殖研究所養殖技術部から分与されたものを F 培地で予備培養したものを用いた。なお、F 培地および養魚廃棄物+Fe+Mn 培地の組成は、第 2 章の方法に準じて作製した。

F 培地で予備培養した藻体を、各培地に 50mL/L の割合で接種し、接種時キートセロスおよびテトラセルミスの藻体密度は、それぞれ $1.10 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ および $0.61 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ であった。培養には、6L サージタンク(柴田科学(株))を用い、培養液の量は 5L とした。通気による細菌のコンタミネーションを防ぐため、吸気口に PTFE メンブレン装着フィルターユニット(Millex[®] FH50、日本ミリポア(株))、排気口にシリコン栓(C-50、信越ポリマー(株))を取り付け、無調整空気を 5 L/min の割合で通気した。光源には白色蛍光灯(FL40SS-W/37、東芝(株))を用い、PPFD $264.3 \mu\text{mol/m}^2/\text{s}$ で下方から上方へと照射し、12L:12D の光周期で培養した。培養時の温度は $27.5 \pm 0.2 \text{ }^\circ\text{C}$ であった。培養は 2 反復で行った。

回収方法

藻体懸濁液容量を滅菌蒸留水にて毎日調整し、1mL の藻体懸濁液を採取して細胞密度を計数した。前日の細胞密度よりも減少もしくは停滞が認められた段階で培養を終了し、遠心分離機(SPX-201、トミー工業(株))により藻体を回収した。回収後、 -20°C の冷凍庫で予備凍結し、凍結乾燥機(FDU-506、東京理化機器(株))により凍結乾燥を行った。8300rpm で 10 分間、濃縮回収を行った。回収した藻体は -80°C で予備凍結し、凍結乾燥機により凍結乾燥を行った後、 -25°C の冷庫に保存し、栄養分析を行った。

なお、培養期間はキートセロスで 14 日間、テトラセルミスで 7

日間であり、回収時の乾燥重量はキートセロスで F 培地区が 1060 mg/L 、養魚廃棄物+Fe+Mn 区で 945mg/L、テトラセルミスで F 培地区が 914 mg/L 、養魚廃棄物+Fe+Mn 区で 927mg/L であった。

分析方法

回収された藻体を、粉碎機を用いて摩砕し、それぞれ粗脂肪含量、脂肪酸組成、粗タンパク質含量およびアミノ酸組成を分析した。粗脂肪含量は Folch 法、脂肪酸組成は 50%KOH とエタノールでケン化した後に 7%三フッ化ホウ素メタノール溶液でメチル化した物をヘキサンに溶解してガスクロマトグラフにより分析した。粗タンパク質含量はケルダール法を用いて分析した。構成アミノ酸組成は、凍結乾燥した試料をガラスチューブに入れ、それに 4mol/L メタンスルモン酸溶液(WAKO)1mL を注入後、加熱ブロック (Dri-Bath, Barnstead Type 17600)を用いて真空状態、110℃ で 24 時間の加水分解し、その後 3.5N の NaOH を 1mL で中和し 10mL に定溶したものを、全自動アミノ酸分析機(JLC-500, 日本電子(株))により分析を行った。遊離アミノ酸組成は 2%スルホサリチル酸を加え、ホモジナイザーを用いて均一化した後、3,000rpm で 15 分間遠心分離した試料の上澄み液を 50mL に定容したものを全自動アミノ酸分析機により分析を行った。得られたデータについて培地間で比較を行った。

結 果

キートセロスとテトラセルミスの粗脂肪(乾燥重量当たり)含量および粗タンパク質含量を Table 10 に示す。キートセロスの

粗脂肪含量は養魚廃棄物+Fe+Mn 区が F 培地より 1.4 倍多かったが、粗タンパク質含量(乾燥重量当たり)は、養魚廃棄物+Fe+Mn 区と F 培地では大きな差は認められなかった。テトラセルミスでは粗脂肪含量、粗タンパク質含量において差は認められなかった。

F 培地および養魚廃棄物+Fe+Mn 培地で培養したキートセロスおよびテトラセルミスの脂肪酸組成(area%)を Table 11 に示す。キートセロスにおいてリノール酸(LA)、リノレン酸(LNA)、エイコサペンタエン酸(EPA)およびドコサヘキサエン酸(DHA)といった n-3 高度不飽和脂肪酸(n-3HUFA)の含量は培地間で同等の値を示したが、16:0 脂肪酸は F 培地で 12.6%、養魚廃棄物+Fe+Mn 区で 8.1%と差が認められた。一方、テトラセルミスでは脂肪酸組成において差が認められなかった。

同様に構成アミノ酸含量を Table 12 に示す。キートセロスおよびテトラセルミスにおいて、トリプトファンは検出されなかった。キートセロスではトリプトファンを除き、それぞれの構成アミノ酸含量は養魚廃棄物+Fe+Mn 区の方が若干多く含まれ、構成アミノ酸総量を比較すると F 培地で 26.07g/100g、養魚廃棄物+Fe+Mn 区で 29.83g/100g となり、養魚廃棄物+Fe+Mn 区の方が高くなった。テトラセルミスでは構成アミノ酸含量において差は認められず、ほぼ同等の値であった。

さらに両培地で培養したキートセロスおよびテトラセルミスの遊離アミノ酸含量を Table 13 に示す。キートセロスにおいて必須アミノ酸の含量は養魚廃棄物+Fe+Mn 区が F 培地より 1.7 倍多く、特に養魚廃棄物+Fe+Mn 区から回収された藻体の

ヒスチジン、フェニルアラニン、チロシン、ロイシン、およびバリン含量は、F 培地と比較し、2 倍以上となった。非必須アミノ酸の含量は養魚廃棄物+Fe+Mn 区が F 培地より 2.2 倍多くなった。特に養魚廃棄物+Fe+Mn 区のタウリン、グリシン、セリンおよびアスパラギン酸含量は F 培地に比べ、2 倍以上であった。また、テトラセルミスでは遊離アミノ酸含量において両試験区間で差が認められなかった。

考 察

本実験において、養魚廃棄物+Fe+Mn 培地および F 培地で培養したキートセロスは粗タンパク質含量において同等の値であり、差は認められなかった。粗脂肪含量、脂肪酸組成、構成および遊離アミノ酸含量に両試験区間で差が見られ、養魚廃棄物+Fe+Mn 区の脂質の蓄積および数種の遊離アミノ酸の蓄積が顕著に高かった。第 2 章の結果から多量の塩化物イオンおよび硫酸イオン、塩化鉄(Ⅲ)・六水和物および塩化マンガン(Ⅱ)・四水和物はキレートを使用せず、水和物の形で添加していることから、これらの要因が増殖阻害に結び付いたものと推察される。そのため、養魚廃棄+Fe+Mn 区において増殖速度が F 培地によりも劣るという結果となった。また、この増殖の遅延により、脂質の蓄積および数種のアミノ酸含量の増加を引き起こした可能性もある。このことから、培養期間による各種栄養素の変化についても今後検討する必要があると考えられた。

一方、テトラセルミスでは養魚廃棄物および鉄・マンガンを追加した 4 区において F 培地区とほぼ同様の培養期間と培養結

果が得られた(Fig. 9)。本章で行った F 培地と養魚廃棄物+Fe+Mn 培地で培養した藻体の栄養分析結果では粗タンパク質含量、脂肪酸組成、構成アミノ酸含量および遊離アミノ酸含量において差が認められなかった。テトラセルミスは培地の組成によって栄養成分が変化すると報告されている(Lourencoa et al., 1997)が、本研究において養魚廃棄物+Fe+Mn 培地で培養した藻体は F 培地で培養した藻体と類似した組成であった。このことから、培地自体も F 培地に則した組成で作製できたと考えられる。

また、キートセロスとテトラセルミスの各培地における培養日数と栄養分析結果の比較から、キートセロスの培養期間の異なることが粗脂肪含量、脂肪酸組成および構成および遊離アミノ酸含量の差に起因する可能性もある。

クルマエビ幼生は必脂肪酸として LA、LNA、EPA や DHA 等の n-3HUFA を要求し、必脂肪酸としての効果は $LA < LNA < EPA \leq DHA$ であることが明らかにされている(金沢, 1993)。脂肪酸組成については培地によって若干の差異はあるが、キートセロスとテトラセルミスで異なる組成をそれぞれ示した。キートセロスは海産魚介類に有効な EPA を比較的豊富に含んでおり、DHA も脂肪酸全体の 1%程度含んでいた。一方テトラセルミスは LNA を多く含み、量的には少ないが EPA および DHA も含んでいた。微細藻類の脂肪酸組成は培養条件により変化することも示されており(Mortensen et al., 1988)、今後は培養条件と栄養組成との関係について検討する必要がある。

甲殻類のアミノ酸要求については、生化学的手法により、クルマエビの必アミノ酸は、アルギニン、メチオニン、バリン、

スレオニン、イソロイシン、ロイシン、リジン、ヒスチジン、フェニルアラニン、トリプトファンの 10 種であることを明らかにされている (Kanazawa and Teshima, 1981; 越塩, 2006)。養魚廃棄物+Fe+Mn 培地で培養したキートセロスおよびテトラセルミスは F 培地を用いて培養した藻体の構成および遊離アミノ酸と同等、もしくは数種のアミノ酸においては含量が高いという結果が得られ、上記、10 種のアミノ酸も構成および遊離アミノ酸の両方もしくはいずれかに十分に含まれていることから、餌として栄養要求に満たしている可能性は大きいと判断された。

これらの微細藻類をクルマエビ幼生の初期餌料として利用することを想定した場合、養魚廃棄物+Fe+Mn 区から回収された藻体は F 培地より高い栄養素を含むと考えられた。また、グリシンはクルマエビの摂餌促進物質となることが明らかにされている (Deshimaru and Yone, 1978)。遊離アミノ酸中のグリシン含量については、養魚廃棄物+Fe+Mn 区が F 培地より 2.9 倍多かったことから、養魚廃棄物+Fe+Mn 区から回収された藻体は F 培地から回収された藻体と比較した場合、クルマエビの幼生の餌料として摂餌性においても有用であることがと示唆された。

本栄養分析の結果から、閉鎖循環式養殖システムから回収された物質に鉄およびマンガンを追加した培地で培養したキートセロスおよびテトラセルミスの藻体は栄養成分についても合成培地と同等かそれ以上の栄養素を含むことがわかり、種々の水産生物への供給の可能性が見出された。

小 括

本章では F 培地および第 2 章の研究で十分な藻体回収が可能であった飼育排水+沈殿物+Fe+Mn 培地を用いてキートセロスおよびテトラセルミスの拡大培養を行った後、藻体を回収して粗脂肪・粗タンパク含量および脂肪酸・構成アミノ組成・遊離アミノ組成の比較を行った。キートセロスの粗脂肪含量は飼育排水+沈殿物+Fe+Mn 培地区が F 培地より 1.4 倍多かったが、n-3 高度不飽和脂肪酸 (n-3HUFA) 含量および粗タンパク質含量では大きな差は見られなかった。

構成アミノ組成において差は認められなかったが、遊離アミノ酸含量について必須アミノ酸含量は養魚廃棄物+Fe+Mn 培地区が F 培地より 1.7 倍多かった。非必須アミノ酸の含量は養魚廃棄物+Fe+Mn 区が F 培地より 2.2 倍多かった。一方、テトラセルミスでは分析した全項目においてほとんど差は見られなかった。

本栄養分析の結果から、閉鎖循環式養殖システムから回収された物質に鉄およびマンガンを添加した培地で培養したキートセロスおよびテトラセルミスの藻体は栄養成分についても合成培地と同等かそれ以上の栄養素を含むことが分かった。

Table 10 Crude lipid and protein compositions of *Chaetoceros gracilis* and *Tetraselmis tetrahele* cultured in F medium and enriched aquacultural waste medium

	<i>C. gracilis</i>		<i>T. tetrahele</i>	
	F medium	Aquacultural waste	F medium	Aquacultural waste
Crude lipid (% d. b.)	15.5	22.1	13.6	11.8
Crude protein (% d. b.)	34.1	36.0	20.3	21.5

Table 11 Fatty acid compositions of *Chaetoceros gracilis* and *Tetraselmis tetrathele* cultured with (area %) cultured in F medium and enriched aquacultural waste medium

	<i>C. gracilis</i>		<i>T. tetrathele</i>	
	F medium	Aquacultural waste	F medium	Aquacultural waste
14:0	16.8	22.7	0.5	0.5
16:0	12.6	8.1	22.4	21.7
16:1n-7	26.6	21.6	0.7	0.5
16:2n-4	2.0	1.1	2.0	1.7
16:3n-6	10.3	9.6	0.3	0.6
16:3n-3	0.1	0.1	18.7	17.2
18:0	0.5	0.5	0.3	0.4
18:1	1.3	0.9	6.1	6.0
18:2n-6(LA)	0.8	1.0	5.9	6.2
18:3n-6	0.6	1.0	0.4	0.5
18:3n-3(LNA)	0.2	0.3	24.9	23.3
18:4n-3	0.3	0.2	1.9	1.8
20:3n-6	0.1	0.1	0.2	0.1
20:4n-6	2.7	6.2	0.9	0.9
20:3n-3	0.1	0.2	0.1	0.1
20:4n-3	tr	tr	0.6	0.6
20:5n-3(EPA)	10.7	12.6	3.6	3.4
22:5n-3	n.d.	tr	0.2	0.4
22:6n-3(DHA)	1.1	1.0	0.1	0.1

n.d : not detected

tr : trace

Table 12 Constituent amino acid compositions (dry basis: g / 100g wt) of *Chaetoceros gracilis* and *Tetraselmis tetrathele* cultured in F medium and enriched aquacultural waste medium

	<i>C. gracilis</i>		<i>T. tetrathele</i>	
	F medium	Aquacultural waste	F medium	Aquacultural waste
Essential amino acid				
Arginine	0.84	1.27	0.82	0.85
Lysine	1.76	2.09	1.18	1.06
Histidine	0.23	0.41	0.24	0.22
Phenylalanine	1.76	1.86	0.95	0.96
Tyrosine	1.55	1.51	0.63	0.78
Leucine	2.58	2.59	1.43	1.45
Methionine	0.34	0.61	0.26	0.29
Valine	0.93	1.5	0.81	0.86
Threonine	0.94	1.57	0.82	0.79
Tryptophan	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Non-essential amino acid				
Taurine	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Alanine	2.2	2.08	0.9	0.85
Glutamic acid	5.29	6.01	2.47	2.75
Glycine	1.86	1.77	0.97	0.9
Serine	1.39	1.78	0.73	0.66
Aspartic acid	3.72	3.93	1.76	1.62
Proline	0.71	0.84	0.99	0.83
Total	26.07	29.83	14.94	14.88

n.d : not detected

Table 13 Free amino acid compositions (dry basis: mg / 100g wt) of *Chaetoceros gracilis* and *Tetraselmis tetraathele* cultured in F medium and enriched aquacultural waste medium

	<i>C. gracilis</i>		<i>T. tetraathele</i>	
	F medium	Aquacultural waste	F medium	Aquacultural waste
Essential amino acid				
Arginine	58.3	30.8	92.7	105.0
Lysine	115.0	184.5	63.0	55.6
Histidine	9.0	18.7	2.4	n.d.
Phenylalanine	50.8	104.5	7.8	5.1
Tyrosine	41.6	100.7	4.3	n.d.
Leucine	63.8	145.3	19.6	17.3
Methionine	24.1	40.4	2.3	n.d.
Valine	39.8	108.8	15.6	7.1
Threonine	36.0	35.8	15.6	15.6
Tryptophan	40.2	35.7	4.2	1.5
Non-essential amino acid				
Taurine	68.6	165.1	34.5	37.2
Alanine	206.7	285.7	82.7	70.8
Glutamic acid	108.6	190.7	440.4	369.3
Glycine	28.5	82.1	13.5	14.1
Serine	67.3	278.1	14.1	14.9
Aspartic acid	34.4	87.7	41.9	25.9
Proline	n.d.	53.4	n.d.	n.d.

n.d : not detected

総 括

本研究ではトラフグの閉鎖循環式養殖における飼育排水や沈殿物(養魚廃棄物)に蓄積された物質の除去・再利用を目的に、クルマエビ幼生等の初期餌料となるキートセロス *Chaetoceros gracilis* およびテトラセルミス *Tetraselmis tetrathele* を用いて培養を試みた。

第 1 章では自ら必要とする元素のみを吸収し、その藻体組成に反映させる微細藻類の特性にしたがって、藻体組成に類似した元素割合の培地を作製することで効率的な藻体の生産を行うことが可能であると考え、キートセロスおよびテトラセルミス藻体の窒素およびミネラル組成と養魚廃棄物の元素組成との比較を行った。

養魚廃棄物を用いて培養するにあたり、藻体が必要とする元素および培地中元素濃度を把握することが必要となる。そこで一般的な藻類培養培地である人工合成培地、F 培地を用いてキートセロスおよびテトラセルミスの培養を行い、一般的な藻体組成を把握した。また、閉鎖循環式養殖システムで飼育されたトラフグの飼育排水、沈殿物、泡沫分離装置内の液体および固形物の窒素・ミネラル濃度および含有量と、キートセロスおよびテトラセルミス藻体の元素含有量を、飼育排水の窒素濃度とキートセロスおよびテトラセルミスの窒素含有量を同等としてその他のミネラル組成を比較し、藻体に対するトラフグ養魚廃棄物 4 種に含まれる元素濃度および含有量の過不足判定を行った。その結果、キートセロスは泡沫固体や沈殿物と混合することによりカリウム、マグネシウム、カルシウム、コバルト、銅、モリブデン、リンおよび亜鉛は養殖廃棄物 4 種を混合す

ることで藻体組成を上回ることが分かった。一方、鉄およびマンガンは養殖廃棄物 4 種を混合してもキートセロスおよびテトラセルミスの両藻体組成を参考に算出した必要元素量に達していなかった。

以上のことから、養殖廃棄物培地を作製する際に添加が必要な元素は、鉄およびマンガンであると考えられた。

第 2 章は実際に飼育排水と硫酸で可溶化した沈殿物を混合して培地を作製し、キートセロスおよびテトラセルミスの培養を行うとともに、不足元素である鉄およびマンガンの添加効果も調査した。キートセロスは養魚廃棄物+Fe+Mn 区で細胞密度・乾燥重量において他の区よりも高い値を示したが、最大密度に達するまでの期間が最も長くなった。一方、飼育排水区では最大密度は最も低かった。養魚廃棄物区でも培養は可能であったが、鉄やマンガンを追加した区の最大密度が高くなり、不足元素の添加効果が認められた。一方、テトラセルミスでは飼育排水区以外の試験区で F 培地と同等もしくはそれを上回る培養結果が得られた。しかし、不足元素を追加した区では添加しない区と比較し、若干高い藻体回収量が得られた。郭培地で培養したキートセロスおよびテトラセルミス両藻体の窒素およびミネラル組成を把握した結果、それぞれの培地の組成を反映したため、鉄・マンガンを追加した区では F 培地の含量と同等もしくはそれ以上の含量であった。

第 3 章では、第 2 章の培養結果から、F 培地および十分な藻体回収が可能であった養魚廃棄物+Fe+Mn 培地で拡大培養を行った後、藻体を回収して粗脂肪・粗タンパク質含量および脂肪酸・遊離アミノ組成の比較を行った。キートセロスの粗脂肪含量は養魚廃棄物+Fe+Mn 区が F 培地より 1.4 倍多かったが、n-3 高度不飽和脂肪酸

(n-3HUFA)含量および粗タンパク質含量では大きな差は見られなかった。遊離アミノ酸含量は必須アミノ酸含量は飼育排水+沈殿物+Fe+Mn 培地区が F 培地より 1.7 倍多かった。一方、テトラセルミスでは分析した全項目において差は認められなかった。

本研究から閉鎖循環式養殖システムから回収された物質に不足元素を添加することでキートセロスおよびテトラセルミスの培養が十分に可能であることが明らかとなり、栄養についても合成培地と同等かそれ以上の栄養素を含むことが明らかとなった。

今後の研究では閉鎖循環式養殖システムによるクルマエビの種苗生産を行う。具体的には餌料栄養および水環境の観点から飼育実験を行い、物質循環および疾病発生抑制について検討を行う。すなわち 1)閉鎖循環式養殖システムによる親エビ養成の検討、2)環境制御技術による採苗の検討および人工生態系養殖に向けた 3)飼育排水および沈殿物を用いて培養した藻類のクルマエビ幼生に対する餌料価値の検討を行う。

4 種類の養殖廃棄物を培地に用いたクルマエビの幼生の初期餌料であるキートセロスおよびテトラセルミスの生産が可能であれば、餌料の生産と水質浄化を同時に行う新しい養殖方式を確立できる。

謝 辞

本研究の実施するにあたり、ご指導およびご鞭撻を賜った、東京海洋大学水族養殖学研究室教授 竹内俊郎博士、同研究室助教 遠藤雅人博士に感謝の意を表する。論文のご校閲をいただいた増殖生態学研究室准教授 濱崎活幸博士に謝意を表する。

また、一般組成分析に便宜を図ってくださった水族養殖学研究室の栗原紋子博士、ならびに滝田 愛修士に心から御礼申し上げる。

最後に、研究活動を行うにあたり、多大なる激励、ご指導を頂いた水族養殖学研究室および水族栄養学研究室の皆様に深く感謝の意を表す。

引用文献

- Bower, C. E. and Bidwell, J.P. (1978): Ionization of ammonia in seawater: effects of temperature, pH and salinity. *J. Fish. Res. Board Can.*, **35**, 1012-1016.
- 張 鉄 明 (2000): Effects of Zn, Fe, Mn on the cell multiplication of phytoplankton in fresh water. 博士論文, 中国科学院, 上海.
- Deshimaru, O. and Yone, Y. (1978): The effects of seven individual dispensable amino acids and betaine on feed ingestion by prawn, *Penaeus japonicus*, were compared with that of an amino acid mixture. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **44**, 903-905.
- 遠藤雅人(2008): 進化する水産養殖技術(第 2 回)閉鎖循環式養殖システム. *食品と容器*, **49**(8), 446-452.
- 遠藤雅人(2010): 活かす水産の研究最前線--生産現場と食につながるトピックス(第 2 回), 閉鎖循環式養殖の新たな展開. *月刊養殖*, **47**(3), 66-69.
- 遠藤雅人, 竹内俊郎(2004): 緑藻セネデスムスを用いた養魚廃棄物中の栄養塩除去. *生態工学*, **16**(3), 195-201.
- 遠藤雅人, 竹内俊郎(2013): 閉鎖系における魚類の生産と微小重力の影響. *Int. J. Microgravity Sci. Appl.*, **30**(2), 111-119.
- FAO Fisheries and Aquaculture Department (2012): The State of World Fisheries and Aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 209 pp.
- 藤田信一, 窪田 久, 野中 忠 (1986): クルマエビ種苗生産にみられた密度効果の一例. *静岡水試研報*, **21**, 37-40.
- 福所邦彦, 岡内正典, Siti NURAINI, 辻ヶ堂諦, 渡辺 武 (1984): テ

- トラセルミスで培養したシオミズツボウムシのマグイ仔稚魚に対する餌料価値. *日水誌*, **50**(8), 1439-1444.
- 福所邦彦, 岡内正典, 田中秀樹, Wahyuni S. I., Kraisingdecha P., 渡辺武 (1985): テトラセルミスで培養したシオミズツボウムシのヒラメ仔魚に対する餌料価値. *養殖研報*, **7**, 29-36.
- Guillard, R.R.L. (1975): Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates in "Culture of Marine Invertebrate Animals." (eds: Smith W.L. and Chanley M.H.) Plenum Press, New York, USA. pp 26-60.
- Guillard, R.R.L. and Ryther, J.H. (1962): Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve. *Can. J. Microbiol.* **8**, 229-239.
- 原島 省(2008): 海洋生態系におけるケイ藻とシリカの役割. *環境バイオテクノロジー学会誌*, **8**, (1), 9-16.
- 平田八郎 (1964): 屋島事業場における餌料生物の培養(その1). *栽培漁業ニュース No.2*, 瀬戸内海栽培漁業協会, 神戸, pp. 3-4.
- 伊勢田亜美(2008): 閉鎖循環養殖システムを用いたトラフグ中間養成における水処理システムの比較とその窒素およびリン収支に関する研究. 学士学位論文, 東京海洋大学, 東京.
- 岩崎英雄(1967): 微細藻類の栄養要求. *日水誌*, **33**(11), 1072-1082.
- 金沢昭夫(1993): 水産動物における高度不飽和脂肪酸およびリン脂質の生理効果. *水産学シリーズ96「水産脂質ーその特性と生理活性」*. 恒星社厚生閣, 東京, pp. 69-79.
- Kanazawa, A. and Teshima, S. (1981): Essential amino acids of the prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **47**, 1357-1377.
- 金子義昂(2011): 閉鎖循環式海産魚飼育における泡沫分離処理による汚

- 濁物質除去に関する研究，修士学位論文，東京海洋大学大学院，東京。
- 加藤元一，岡内正典，中神秀一(2004): 珪藻類キートセロス属 2 種の濃縮技術の開発と濃縮細胞の再生. **52**(3), 231-237.
- 越塩俊介 (2006): 4-3、栄養と飼料、b.甲殻類の栄養要求，「水産大百科事典」. (独立法人水産総合研究センター編) 朝倉書店，東京，pp.319-320.
- Lim, B. K. and Hirayama, K. (1993a): Effect of stocking density on the yield of larval mass production of kuruma prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**(2), 229-235.
- Lim, B. K. and Hirayama, K. (1993b): Growth and elemental composition (C, N, P) during early larval stages of mass cultured kuruma prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**(2), 237-243.
- Lourencoa, S. O., Marquez, U. M. L., Mancini-Filhob, J., Barbarinoa, E. and Aidar, E. (1997): Changes in biochemical profile of *Tetraselmis gracilis*. Comparison of two culture media. *Aquaculture* **148**, 153–168.
- 丸山俊朗，鈴木祥広，佐藤大輔，神田 瓶，道下 保(1998): 泡沫分離・硝化システムによるとラメの閉鎖循環式養殖，*衛生工学シンポジウム論文*集, 6(2), 270-274.
- 森裕一郎，遠藤雅人，竹内俊郎(2006): 養魚廃棄物を用いた魚類初期餌料の生産. 2006 生態工学会年次大会発表要旨集, pp. 153-157.
- Mortensen, S. H., Børsheim, K. Y., Rainuzzo, J. and Knutsen G. (1988): Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt. Effects of silicate deprivation, temperature and light intensity. *J. Expt. Marine Biol. Ecol.*, **122**(2), 173-185.
- Nevejan, N., Saez, I., Gajardo, G. and Sorgeloos, P. (2003): Energy vs. essential fatty acids: what do scallop larvae (*Argopecten purpuratus*) need most? *Comp. Biochem. Physiol. Part B*, **134**(4), 599-613.

- 能登谷正浩(2001): アオサの利用と環境修復. 成山堂書店, 東京, 188p.
- Okauchi, M. and Hirano, Y. (1986): Nutritional value of *Tetraselmis tetrathele* for larvae of *Penaeus japonicas*. *Aquaculture*, **9**, 29-33.
- 岡内正典 (1988): テトラセルミス *Tetraselmis tetrathele* (West, G. S.) Butcher の大量培養に関する研究. *養殖研報*, **14**, 1-123.
- 岡内正典 (2002): 海産魚介類の初期餌料用微細藻類の大量培養技術の開発. *日水誌*, **68**(5), 625-628.
- 岡内正典, 福所邦彦 (1984): プラシノ藻類テトラセルミス *Tetraselmis tetrathele* の培養特性. *養殖研報*, **5**, 1-11.
- Okauchi, M. and Kawamura, K. (1997): Optimum medium for largescale culture of *Tetraselmis tetrathele*. *Hydrobiologia*, **358**, 217-222.
- Rafiee, G. and Saad, C. R. (2005): Nutrient cycle and sludge production during different stages of red tilapia (*Oreochromis* sp.) growth in a recirculating aquaculture system. *Aquaculture*, **244**, 109-118.
- Ronquillo, J. D., Matias, J. R., Saisho, T. and Yamasaki, S. (1997): Culture of *Tetraselmis tetrathele* and its utilization in the hatchery production of different penaeid shrimps in Asia. *Hydrobiologia*, **358**, 237-244.
- Seawright, D. E., Stickney R. R., Walker, R. B. (1998): Nutrient dynamics in integrated aquaculture-hydroponics systems. *Aquaculture*, **160**, 215-237.
- 鈴木祥広・丸山俊朗・竹本進・小田リサ(1999): 泡沫分離・硝化脱窒システムによるウナギの閉鎖循環式高密度飼育. *水環境学会誌*, **22**, 896-903.
- 鈴木祥広・丸山俊朗・佐藤大輔・神田猛・道下保(2000): 閉鎖循環式泡沫分離硝化システムを用いたヒラメの飼育における飼育水水質および物質収支. *日水誌*, **66**(1), 1-9.

- 鈴木祥広，丸山俊朗 (2001): 鉄塩凝集剤と乳製カゼインを用いた凝集・泡沫分離法による懸濁物除去に関する基礎的研究：カゼインの役割．*水環境学会誌*, **24**(5), 317-324.
- 滝田 愛(2012): 養魚廃棄物を用いたシオミズツボムシの生産に関する基礎的研究．修士学位論文，東京海洋大学，東京．
- 辻 洋一、小泉嘉一(2009): 閉鎖性水産海洋の水質浄化対策．第 11 回ジャパン・インターナショナルシーフードショウ同時開催セミナー講演要旨, pp. 4-6.
- 吉野博之，Gruenberg, D. E., 渡部，勇，宮嶋克己，佐藤 修 (1999): 閉鎖循環式養殖システムにおける脱窒．*水産増殖*, **47**(3), 445-451.